

Université de Sherbrooke

Caractérisation partielle de récepteurs lymphocytaires
de la phytohémagglutinine de Phaseolus vulgaris

par

© Ginette Lagacé

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention
du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

septembre 1986

Permission has been granted to the National Library of Canada to microfilm this thesis and to lend or sell copies of the film.

The author (copyright owner) has reserved other publication rights, and neither the thesis nor extensive extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her written permission.

L'autorisation a été accordée à la Bibliothèque nationale du Canada de microfilmer cette thèse et de prêter ou de vendre des exemplaires du film.

L'auteur (titulaire du droit d'auteur) se réserve les autres droits de publication; ni la thèse ni de longs extraits de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation écrite.

ISBN 0-315-36167-0

A mes parents, en gage d'affection et d'estime pour m'avoir
permis de faire ce que j'aime.

TABLE DES MATIERES

Liste des illustrations.....	I
Liste des tableaux.....	III
Liste des sigles, abréviations et symboles.....	IV
Résumé.....	V
1.0 Introduction	
1.1 La phytohémagglutinine (PHA) de <u>Phaseolus vulgaris</u>	1
1.2 Activation lymphocytaire.....	3
1.3 Evènements métaboliques observés lors des étapes menant à la transformation lymphocytaire.....	5
1.4 Modèle d'activation lymphocytaire induite par les lectines ou par les antigènes.....	8
1.5 Etude des propriétés physiques des glycoprotéines de la surface des lymphocytes reconnues par la PHA.....	14
1.6 Les réactifs bifonctionnels.....	17
1.7 But du travail.....	27
2.0 Matériel et méthodes.....	29
2.1 Isolement des lymphocytes spléniques porcins.....	30
2.2 Purification de la PHA.....	31
2.2.1 Couplage de la PHA à de l'Affi-Gel 10.....	31
2.3.1 Culture des bactéries <u>Staphylococcus aureus</u> Cowan I.....	31
2.3.2 Préparation des bactéries comme immunoadsorbant.....	32
2.3.3 Isolement de la protéine A.....	32
2.4.1 Phosphorylation des protéines membranaires de lymphocytes en présence de PHA.....	33

2.4.2 Chromatographie des protéines phosphorylées sur colonne	
Affi-Gel 10-PHA.....	34
2.4.3 Electrophorèse des échantillons radioactifs.....	35
2.5.0 Structures des réactifs hétérobifonctionnels utilisés.....	36
2.6.0 Modification de la PHA avec les réactifs hétérobifonction-	
nels.....	39
2.6.1 Réactifs hétérobifonctionnels I et II.....	39
2.6.2 Composé hétérobifonctionnels [³⁵ S]-SNAP (III).....	40
2.7.0 Iodation de la PHA modifiée avec le réactif I ou II.....	40
2.8.0 Expérience d'irradiation des complexes lymphocyte-PHA modi-	
fiée radioactive.....	41
2.8.1 Solubilisation des lymphocytes irradiés:	
Traitement au NP-40.....	42
Traitement au SDS.....	42
2.8.2 Immunoprécipitations des échantillons solubilisés au NP-40	43
2.9.0 Iodation des protéines membranaires de lymphocytes purifiés	43
2.10.0 Analyse des protéines irradiées radioactives ' par la technique	
diagonale.....	45
2.11.0 Marquage des protéines à l'iode 125 après séparation sur gel	
de polyacrylamide en présence de SDS.....	46
2.12.0 Etude de la liaison de la PHA- ¹²⁵ I aux protéines séparées	
par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de	
SDS.....	47
3.0 Résultats	
3.1 Etudes de phosphorylation	
3.1.1 Chromatographie des échantillons de protéines lymphocytai-	
res phosphorylées sur colonne d'Affi-Gel 10-PHA.....	48
3.1.2 Electrophorèse des solubilisats de lymphocytes phosphory-	

l��s et stimulés par la PHA avant et après élution sur une colonne d'Affi-Gel 10-PHA.....	48
3.2.0 Marquage <u>in situ</u> par photoaffinité de (des) récepteur(s) de la PHA.....	51
3.2.1 Analyse des solubilisats de lymphocytes incubés avec PHAm- ^{125}I -I ou PHAm- ^{125}I -II et phosphorylés, par ��lectropho- r��se sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	51
3.2.2 Analyse de lymphocytes incubés avec de la PHAm- ^{125}I -II photolysés et solubilisés. L'électrophorèse �� été faite par gel SDS-PAGE selon la technique diagonale et il y a eu réiodation des composants du gel obtenu.....	54
3.2.3 Mise en évidence des protéines séparées par électrophorèse et liant la PHA- ^{125}I ; les protéines proviennent de lympho- cytes incubés avec de la PHAm- ^{125}I -II et photolysés.....	61
3.2.4 Autoradiogramme de lymphocytes incubés avec de la PHAm-III photolysés, solubilisés et analysés par SDS-PAGE.....	64
3.2.5 Mise en évidence des récepteurs de la PHA à l'aide de lym- phocytes radioiodés incubés avec de la PHAm-II, photolysés et solubilisés. Analyse des solubilisats par gel SDS-PAGE selon la technique diagonale.....	64
4.0 Discussion et conclusion	
4.1 Etude de la phosphorylation des protéines de lymphocytes spléniques porcins stimulés par la PHA.....	68
4.2 Marquage <u>in situ</u> par photoaffinité du (des) récepteur(s) de la PHA.....	70
5.0 Annexe.....	80
Remerciements.....	82
Bibliographie.....	83

RESUME

Ginette Lagacé, Département de Biochimie.

CARACTERISATION PARTIELLE DE RECEPTEURS LYMPHOCYTAIRES DE LA PHYTOHE- MAGGLUTININE DE Phaseolus vulgaris

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences, (M. Sc.)
septembre 1986.

Des réactifs hétérobifonctionnels ont été utilisés dans le but d'étudier et de caractériser les sites de liaison de la PHA (phytohé-magglutinine) sur des lymphocytes spléniques porcins . La PHA a été modifiée par réaction avec le succinimido-6-N-(4-azidobenzyl)aminohexanoate, le succinimido-6-mercapto-S-(4-azidothiophényl)hexanoate ou le 3-[(2-nitro-4-azidophényl)-2-aminoéthylthio]-N-succinimidyl propionate. La lectine modifiée a été incubée avec les lymphocytes, cela suivi d'une irradiation. Les produits de photolyse ont été solubilisés et séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les analyses ont été effectuées de différentes façons. Les résultats ont montré que des protéines réceptrices de 29-31, 34-36, 40, 48-56, 59-65 et 74-78 kilodaltons peuvent être mises en évidence, suivant ces différentes méthodes d'analyse.

De plus, la possibilité d'une phosphorylation des sites récepteurs de la PHA lors de la stimulation par la PHA a été vérifiée. Les résultats ont montré l'absence d'une phosphorylation spécifique.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Modèle d'activation des lymphocytes proposé par Théofilopoulos et al. (1983).....	11
Figure 2 : Structures chimiques de quelques réactifs homo- bifonctionnels.....	20
Figure 3 : Précurseurs de carbènes et de nitrènes.....	23
Figure 4 : Réactions possibles du groupement nitrène généralisé par photolyse.....	25
Figure 5 : Structures des trois réactifs hétérobifonctionnels utilisés pour les marquages <u>in situ</u> des récepteurs de la PHA.....	38
Figure 6 : Patron d'électrophorèse sur gel SDS-PAGE (conditions ré- ductrices) de lymphocytes incubés avec orthophosphate ³² P et stimulés par la PHA.....	53
Figure 7 : Analyse électrophorétique représentative d'un solubilisé de lymphocytes spléniques porcins incubés avec de la PHA- ¹²⁵ I-I et photolysés.....	56
Figure 8 : Représentation schématique de l'autoradiogramme obtenu suite à la réiodation des composants du gel d'une électro- phorèse SDS-PAGE selon la technique diagonale de lymphocy- tes incubés avec de la PHA- ¹²⁵ I-II, photolysés et solu- bilisés.....	60
Figure 9 : Représentation schématique de l'autoradiogramme obtenu après incubation, avec de la PHA- ¹²⁵ I, du gel d'électro- phorèse SDS-PAGE selon la technique diagonale de solubili- sats de lymphocytes incubés avec de la PHA- ¹²⁵ I-II et	

photolysés..... 63

Figure 10: Autoradiogramme d'une séparation sur gel SDS selon la
technique diagonale des protéines du solubilisé obtenu
après marquage des lymphocytes à l'iode 125, incubation
de ceux-ci avec de la PHAm-II et photolyse..... 67

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Résultats de l'élution, sur colonne d'Affi-Gel 10-PHA, de solubilisats de lymphocytes incubés en présence d'or- phosphate ^{32}P et stimulés par la PHA.....	50
Tableau 2: Résultats quantitatifs obtenus par électrophorèse sur gel SDS-PAGE de solubilisats de lymphocytes incubés avec de la PHAm- ^{125}I -I et de la PHAm- ^{125}I -II et photolysés.....	58
Tableau 3: Résumé des résultats obtenus par marquage <u>in situ</u> des ré- cepteurs de la PHA et mise en évidence des protéines ré- ceptrices selon différentes méthodes d'analyse.....	72

LISTE DES SIGLES, ABREVIATIONS ET SYMBOLES

ConA: concanavaline A

DATD: N,N'-diallyltartardiamide

DMF: N,N-diméthylformamide

DMSO: diméthylsulfoxyde

DTT: dithithréitol (réactif de Cleland)

EGF: facteur de croissance épidermique

Hepes: acide N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonique

IGF-1: facteur de croissance semblable à l'insuline (insulin-like growth factor)

IL-1: interleukine 1

IL-2 (TCGF): interleukine 2 ou facteur de croissance des cellules T

La: leucoagglutinine

MHC: complexe d'histocompatibilité majeur

NP-40: détergent Nonidet P-40

PAGE: électrophorèse sur gel de polyacrylamide

PBS: tampon phosphate salin

PDGF: facteur de croissance dérivé des plaquettes

PMSF: fluorure de phenylmethylsulfonyl

PWM: mitogène de "pokeweed" (Phytolacca americana)

RaMB: antiserum de lapin anti-cerveau de souris

SDS: sodium dodecyl sulfate

SNAP: 3-[(nitro-4-azidophényl)-2-aminoéthylthio]-N-succinimidyl propionate

TCA: acide trichloroacétique

THF: tétrahydrofurane

RESUME

Le mécanisme d'activation lymphocytaire par les lectines demeure un sujet d'étude. La première étape de l'activation implique la reconnaissance de sites récepteurs spécifiques au niveau de la membrane. La liaison à ces "récepteurs" induit la transmission d'un signal mitogénique à travers la membrane.

Le but du présent travail est la caractérisation partielle des sites de liaison de la PHA chez les lymphocytes spléniques porcins. Le travail se divise en deux parties. La première partie a été entreprise pour vérifier la possibilité d'une phosphorylation du récepteur de PHA lors de la stimulation induisant la transformation lymphocytaire.

Des lymphocytes ont été incubés avec du phosphate radioactif (^{32}P), stimulés pendant différentes périodes de temps par la PHA, solubilisés et chromatographiés sur colonne d'affinité Affi-Gel 10-PHA. Les éluats ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une phosphorylation spécifique des récepteurs durant la période de temps nécessaire aux événements précoces de la transformation lymphocytaire.

La deuxième partie du travail illustre l'utilisation de trois réactifs hétérobifonctionnels photosensibles pour le marquage in situ des sites de liaison de la PHA. Ces réactifs sont le succinimido-6-N-(4-azidobenzyl)aminohexanoate, le succinimido-6-mercapto-S-(4-azidothiophényl)hexanoate et le 3-[(2-nitro-4-azidophényl)-2-aminoéthylthio]-N-succinimidyl propionate.

La PHA a été modifiée avec ces réactifs, radioiodée, incubée avec des lymphocytes, suivi de la photolyse. Après solubilisation les échantillons ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS selon différentes conditions. Les résultats obtenus montrent la présence de sites de liaison possédant des masses moléculaires de 29-31, 34-36, 40, 48-56, 59-65 et 74-78 kilodaltons.

1.0 INTRODUCTION

1.1 La phytohemagglutinine (PHA) de Phaseolus vulgaris

Les lectines sont des protéines qui possèdent la propriété d'agglutiner les cellules sanguines ou autres types cellulaires. Certaines lectines montrent une spécificité de reconnaissance des groupements sanguins et de leurs sous-groupes (Bird, 1959, Boyd, 1970, Watkins et Morgan, 1952, Watkins, 1966). Ces propriétés des lectines étaient connues depuis la fin du 19^e siècle (Sharon et Lis, 1972) et avaient été particulièrement étudiées par Sumner et autres (Sumner et Howel, 1936, Landsteiner, 1945, Kabat et al., 1947, Kunitz et McDonald, 1948, Boyd et Reguera, 1949).

Cependant, en 1960, Nowel faisait une découverte fondamentale. Il observait que des cultures de sang contenant la phytohémagglutinine isolée de Phaseolus vulgaris montraient une transformation lymphoblastique appréciable et les petits lymphocytes au repos entraient en phase mitotique. Cette observation originale a été le début de l'utilisation des lectines comme outil pour l'étude des événements biochimiques impliqués dans la transformation lymphocytaire. Les lectines mitogéniques sont capables d'initier la réaction de transformation lymphoblastique suite à une reconnaissance spécifique d'unités oligosaccharidiques présentes au niveau de la membrane plasmique (Andersson et al., 1972, Andersson et Melchers, 1973, Greaves et Bauminger, 1972). La nature des récepteurs impliqués dans le phénomène d'activation cellu-

laire demeure inconnue, bien qu'il soit généralement accepté que les glycoprotéines membranaires y jouent un rôle essentiel (Dupuis et al., 1985, O'Brien et al., 1979, Favero et al., 1982, Allan et Crumpton, 1973, Palacios, 1982, Prujansky et al., 1978, Hayman et Crumpton, 1972, Henkart et Fisher, 1975, Alexander et al., 1978, Dillner-Centerlind et al., 1980). Cependant, certains auteurs croient que les glycolipides peuvent aussi être impliqués (Spiegel et Wilchek, 1981, Wilchek et al., 1981).

La PHA consiste en un mélange de cinq isolectines tétramériques (Leavitt et al., 1977, Felsted et al., 1975) d'une masse moléculaire de 115 000 daltons, résultant de l'assemblage de deux types de sous-unités (Weber et al., 1967, Leavitt et al., 1977), E et L de 33 000 daltons chacune, qui montrent des spécificités différentes de reconnaissance des oligosaccharides (Weber et al., 1967, Leavitt et al., 1977). La sous-unité L représente l'activité mitogénique pour les lymphocytes et E, l'activité érythroagglutinante (Leavitt et al., 1977)

Par contre, Glad et Borrebaeck (1984) ont montré que les deux sous-unités, E et L, ont une ressemblance étroite dans leur composition en hydrates de carbone et en acides aminés aussi bien que dans leur carte peptidique tryptique et la séquence N-terminal des acides aminés. En fait, l'isolectine érythroagglutinante (E_4) possède elle-même une forte activité mitogénique (tout comme L_4) mais cette activité est masquée par des interférences des composantes du sérum (glycoprotéines), composantes pour lesquelles elle a une forte affinité.

Récemment, les séquences en acides aminés des phytohemagglutinines érythro et leucoagglutinante (PHA-E et PHA-L) ont

été déterminées. Hoffman et Donaldson (1985) ont utilisé une librairie d'ADN λ 1059 de Phaseolus vulgaris variété "Tendergreen" de laquelle ils ont isolé deux gènes: dlec 1 et dlec 2. Ces gènes sont tous deux exprimés dans les tissus du cotyledon et ils codent pour des polypeptides de masses moléculaires très similaires. Toutefois le gène dlec 1 (codant pour la PHA-E) contient trois sites probables de glycosylation alors que le gène dlec 2 (codant pour la PHA-L) en possède deux. Ainsi la migration plus lente de la PHA-E sur gel SDS peut-être reliée à la présence d'une chaîne d'hydrates de carbone additionnelle (Hoffman et Donaldson, 1985). Le gène dlec 1 code pour un peptide signal de vingt et un résidus hydrophobiques (2200 daltons) et une protéine mature de deux cents cinquante quatre acides aminés (27500 daltons) alors que le gène dlec 2 code pour un peptide signal de vingt acides aminés (2200 daltons) et une lectine mature de deux cents cinquante deux résidus (27300 daltons).

1.2 Activation lymphocytaire

Le mécanisme par lequel la PHA stimule les lymphocytes n'est pas connu, mais l'évènement initial est la liaison sélective de la lectine par des récepteurs spécifiques sur la surface cellulaire (Allan et al., 1971, Lindahl-Kiessling et Peterson, 1969, Allan et Crumpton, 1973). Ceci induit la transmission d'un signal mitogénique à travers la membrane plasmique. L'étape de liaison aux récepteurs est essentielle, si elle est empêchée par des sucres ou par le traitement des lymphocytes avec des protéinases, la transformation ainsi que la synthèse d'ADN ne s'effectue pas. Borberg et ses collaborateurs (1968)

ont mis en évidence le fait que le N-acetyl-D-galactosamine, un sucre qui est reconnu spécifiquement par la PHA, inhibe la transformation. De plus, des lymphocytes traités à la trypsine sont réfractaires à l'action de la PHA. En revanche, ces lymphocytes laissés au repos pendant une période de cinq à huit heures, période suffisante pour resynthétiser les constituants membranaires, répondent à la PHA (Lindahl-Kiessling et Peterson, 1969).

La liaison de la PHA aux lymphocytes est obligatoire, mais ne semble pas suffisante pour induire l'activation (Greaves et Janossy, 1972). Ainsi, des études d'absorption avec PHA-I¹²⁵ suggèrent que les cellules T et B ont presque la même densité moyenne de sites de liaison, alors que seules les cellules T sont stimulées et se transforment. La liaison et l'activation subséquente sont inhibées par les mêmes sucres contre lesquels les mitogènes ont démontrés une affinité de liaison directe. Donc les sites sur la surface lymphocytaire sont probablement des unités d'hydrate de carbone de glycoprotéines hétérogènes (Kornfeld et Kornfeld, 1970, Allan et al., 1971).

L'endocytose de la lectine ne semble pas essentielle puisque dans le cas de lectines insolubilisées (PHA, Con A et PWM), celles-ci conservent leur propriété d'activer les lymphocytes (Lis et Sharon, 1973), mais perdent leur spécificité d'activation des cellules T seulement.

Des études de Allan et Crumpton (1973) sur l'interaction lymphocytes-PHA amènent trois conclusions: 1) une petite fraction seulement ($\leq 1\%$) de la PHA nécessaire à la stimulation optimale de la transformation est liée aux lymphocytes 2) la PHA n'est pas liée irréversiblement et, 3) la présence continue de PHA est essentielle (au

moins pendant vingt heures), surtout durant la période initiale pour que la transformation ait lieu. En fait, 30 000 sites de liaison par lymphocytes porcins sont occupés par la PHA, alors que 600 000 sites sont disponibles. Donc, il semble que 95% des sites de liaison potentiels de la PHA ne jouent pas un rôle dans l'initiation de la transformation. Ceux-ci pourraient être des sites "inhibiteurs". De plus, des études (Dupuis et Clairoux-Moreau, 1980) par Scatchard de la liaison PHA-lymphocytes spléniques porcins ont démontré l'existence de deux sites de liaison soient de haute et de faible affinité et que les sites de haute affinité sont probablement ceux impliqués dans le déclenchement de la transformation induite par les lectines mitogéniques.

1.3 Evènements métaboliques observés lors des étapes menant à la transformation lymphocytaire

Il est généralement admis, que lors de la liaison, les lectines mitogéniques induisent des changements spécifiques de la structure membranaire et l'initiation d'une série d'évènements métaboliques résultant en l'augmentation de la synthèse d'ADN et en la division cellulaire (Greaves et Janossy, 1972, Lis et Sharon, 1973, Henkart et Fisher, 1975). Ces changements sont multiples e.g. régénération des tissus et embryogénèse, augmentation de la glycolyse, activité enzymatique lysosomale, augmentation de l'activité du patron nucléaire (nuclear template), acétylation des histones, activité de l'ADN polymérase (Greaves et Janossy, 1972), accélération de la synthèse d'acides gras, changements dans le métabolisme des hydrates de

carbone, augmentation de l'assimilation des petites molécules (sucres, acides aminés et ions Ca^{+} , K^{+} , groupements phosphates inorganiques) (Lis et Sharon, 1973), augmentation du guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et métabolisme accru des phosphatidyls inositols et autres phospholipides (Maino et al., 1974). De plus, ces changements ont lieu en dedans de deux heures suite à la liaison de la lectine (Greaves et Janossy, 1972). Conséquemment tous ces changements conduisent à la synthèse de novo d'ADN et ARN.

La phosphorylation des protéines est un des changements importants observés lors de l'activation des lymphocytes par des agents mitogéniques (Chaplin et al., 1980). Les lymphocytes possèdent toute la machinerie nécessaire pour phosphoryler et déphosphoryler les protéines (Chaplin et al., 1980).

Smith et al. (1971) ont montré que la PHA produit une séquence définie de changements dans l'activité adénylate cyclase et de la concentration d'adénosine 3'-5' monophosphate cyclique (AMPc) dans les lymphocytes du sang humain. Ces variations dans la concentration d'AMPc se situent très tôt (en dedans d'une minute (Murray et al., 1972)). Johnson et al. (1974) utilisant des lymphocytes de cheval stimulés avec Con A ont suggéré que deux évènements précèdent l'activation intensive des gènes promus par les mitogènes: un flux de protéines spécifiques (se liant à la chromatine) passant du cytoplasme au noyau et une augmentation de la phosphorylation des protéines nucléaires acides. Murray et ses collaborateurs (Murray et al., 1972, Kemp et al., 1975) ont trouvé au moins deux protéines-kinases dépendantes de l'AMPc dans des homogénats de lymphocytes humains. En 1976, Horenstein et al., ont montré que la transformation de lymphocytes humains par la PHA est accompagnée d'une augmentation de

l'activité phosphokinase des protéines et que cette activité est maximale environ soixante-dix heures après l'exposition au mitogène. Cette activité élevée est due au niveau accru de quelques unes des multiples formes de protéines-kinases du lymphocyte. Sons et al. (1976) ont montré la présence d'une activité protéine-kinase associée à la chromatine dans le cas de lymphocytes bovins stimulés par la Con A. Wedner et Parker (1975) ont montré une augmentation précoce de la phosphorylation des protéines non-nucléaires dans des lymphocytes humains traités avec des lectines mitogéniques. Byus et al. (1977) ont rapporté qu'une protéine-kinase dépendante de l'AMPc est activée quatre heures après la stimulation des lymphocytes par la Con A. Chaplin et al. (1979) ont montré la présence de protéines-kinases dépendantes de l'AMPc et de protéines acceptrices de phosphate dans les fractions particulières et solubles des lymphocytes humains. De plus, ces mêmes auteurs (1980) ont montré une phosphorylation des protéines accrue sous stimulation mitogénique (Con A, PHA, anticorps de lapin anti bêta-2 microglobuline humaine, ionophore de cations divalents A23187) de lymphocytes du sang humain. Cette phosphorylation accrue est seulement détectée dans la fraction soluble suite à une sonication et consiste en de modestes augmentations dans le contenu en ^{32}P d'un grand nombre de protéines de masse moléculaire variant de 30 000 à 200 000 daltons. Par contre, la phosphorylation d'une protéine discrète de 65 000 daltons de masse moléculaire est largement accrue dans les cellules traitées avec les mitogènes. Ces phosphorylations de protéines solubles produites sous stimulation mitogénique sont maximales à dix minutes.

Wang et al. (1981) ont étudié la phosphorylation des protéines de lymphocytes spléniques de souris suite à l'activation par la Con A.

Les auteurs ont montré que l'intensité d'incorporation de ^{32}P dans deux protéines (135 000 et 150 000 daltons) commence à augmenter, par rapport aux cellules témoins, dix heures après l'addition de Con A et est maximale après cinquante heures d'incubation. L'augmentation de la phosphorylation suit l'augmentation de la synthèse d'ARN mais précède la synthèse d'ADN. De plus, des agents qui inhibent le début de la phase S de division cellulaire empêchent aussi la phosphorylation de ces protéines. Ces traitements inhibiteurs incluent le déplacement de la Con A des récepteurs de surface par l' α -méthyl-mannopyranoside, l'omission de sérum dans le milieu de culture et l'addition d'indométhacine, un inhibiteur de la biosynthèse des prostaglandines.

1.4 Modèle d'activation lymphocytaire induite par les lectines ou par les antigènes

L'activation, la prolifération et la différenciation lymphocytaire n'incluent pas seulement la présentation et la reconnaissance des antigènes ou mitogènes mais aussi une cascade de signaux amplificateurs -médiés par des facteurs solubles- spécifiques ou non spécifiques aux antigènes (Theofilopoulos et al., 1983).

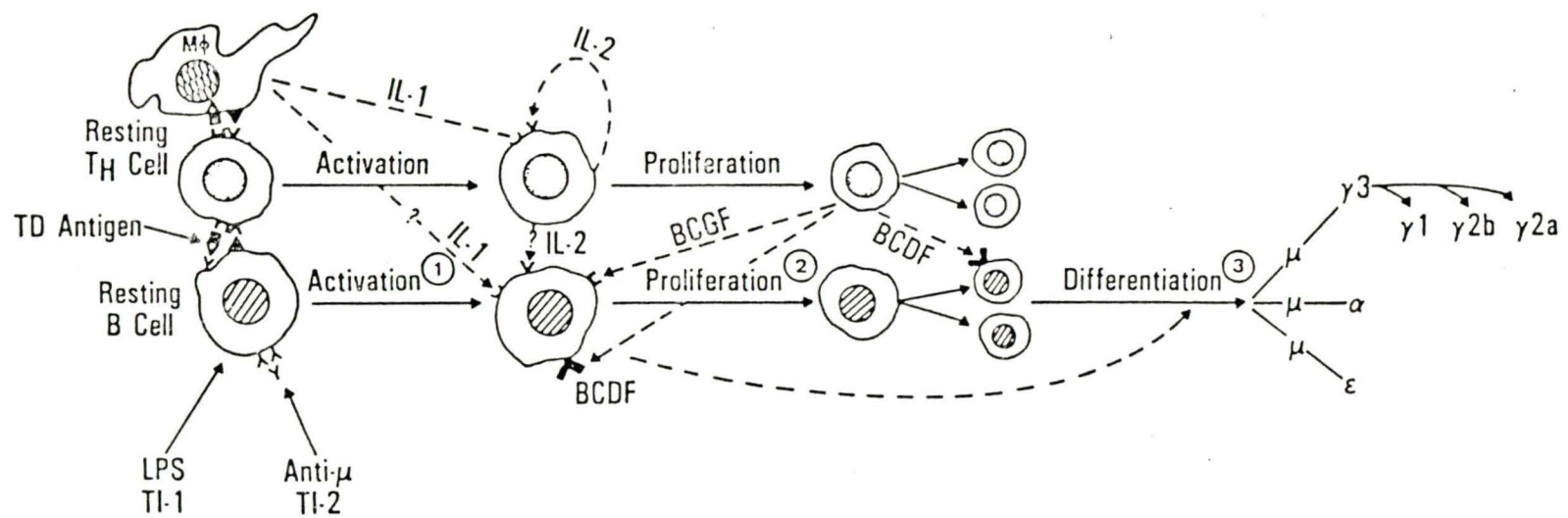
Les cellules T au repos nécessitent trois signaux pour remplir leurs fonctions effectrices. La liaison de l'antigène ou du mitogène à la cellule constitue le signal initial et rend les cellules T sélectionnées sensibles aux signaux inducteurs suivants qui sont les interleukines. Ces interleukines, IL-1 provenant des macrophages et IL-2 provenant des cellules T activées, procurent les signaux additionnels requis pour la prolifération et la différenciation des

cellules T sélectionnées en cellules T effectrices (Theofilopoulos et al., 1983). C'est la découverte de Morgan et al. (1976) qui a apporté une réponse quant au mode d'activation des lymphocytes suite à une stimulation mitogénique. En effet, ces auteurs ont remarqué que le surnageant provenant de cellules mononucléaires stimulées à la PHA contenait un facteur mitogénique (l'interleukine-2 ou TCGF) pouvant supporter la prolifération exponentielle continue de cellules T humaines activées. Le signal initial (la liaison) est obligatoire pour la production de TCGF et pour l'activation des cellules T in vitro. Après ce signal, la présence d'antigène ou de lectine n'est plus nécessaire et les cellules activées prolifèrent indéfiniment en présence de TCGF seulement (Smith, 1980). En absence d'IL-2, les lymphocytes activés cessent de croître et retournent à l'état de petits lymphocytes et finalement meurent (Smith, 1980).

L'acquisition de la réponse au TCGF est médiée par l'apparition de récepteurs membranaires spécifiques au TCGF, récepteurs exprimés sous l'interaction de ligands spécifiques (ConA, PHA, La, RaMB) et aussi par les anticorps OKT3 et les antigènes HLA-DR (Ia chez la souris) (Smith, 1980, Larsson, 1981). Quatre types cellulaires différents sont donc impliqués dans ce schéma complexe de différenciation cellulaire; les cellules adhérentes (via l'IL-1), les cellules productrices de TCGF (les cellules T "helper" ou facilitatrices) et deux sous-groupes de cellules T sensibles au TCGF (les cellules T suppressives, tueuses et facilitatrices) (Bonnard et al., 1979).

Le modèle de Theofilopoulos et al. (1983) résume bien ces différentes étapes de différenciation (figure 1). Des études montrent aussi que les cellules B au repos, comme les cellules T, se transfor-

Figure 1: MODELE D'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES
proposé par Théofilopoulos et al.(1983)



ment en une population accrue de cellules sécrétrices d'anticorps seulement après une série d'évènements de prolifération et de différenciation qui semblent contrôlés par des facteurs solubles et des signaux séparés (figure 1). Généralement, les cellules B au repos nécessitent au moins trois signaux différents pour générer des clones de cellules productrices d'anticorps, ces signaux étant soit dépendants des cellules T ou indépendants des cellules T. Pour les réponses dépendantes des cellules T; un signal est généré lorsque les cellules T "helper" activées reconnaissent les déterminants Ia de même que l'antigène (transporteur) sur les cellules B ou les macrophages. Un autre signal est généré lorsque les cellules B reconnaissent spécifiquement un antigène (haptène) via l'immunoglobuline (Ig) de surface. Ces deux signaux sont nécessaires pour activer les cellules B au repos de la phase G_0 à la phase G_1 du cycle cellulaire auquel temps les cellules B activées acquièrent des récepteurs pour le troisième signal qui est médié par des facteur(s) dérivé(s) des cellules T "helper" Ia négatives et non spécifiques aux antigènes. Certains de ces signaux peuvent être contournés selon le type d'antigène et le sous-groupe de cellules B impliqués. Ainsi pour les antigènes dépendants des cellules T, les trois signaux sont requis, incluant le signal relié au complexe d'histocompatibilité majeur (restriction antigénique).

Cependant, pour les antigènes indépendants des cellules T (TI), la nécessité du signal relié au MHC peut-être contournée soit par l'activité polyclonale de cellule B caractéristique d'une classe d'antigènes (TI) ou via une réticulation du récepteur de l'antigène des cellules B par un des antigènes TI multivalents de la seconde classe. Même si l'étape du MHC peut être contournée par les antigènes TI, les facteurs dérivés des cellules T "helper" (non spécifique aux antigènes)

sont tout de même nécessaires aux réponses des antigènes TI. Ainsi, la nécessité de ces facteurs semble être la nécessité commune et ultime des réponses reliées ou non aux cellules T (Theofilopoulos et al., 1983).

1.5 Etude des propriétés physiques des glycoprotéines de la surface des lymphocytes reconnues par la PHA

Plusieurs laboratoires ont étudié l'interaction lectine-lymphocytes menant à la division cellulaire. L'étape primaire de cette séquence d'évènements est la liaison de la lectine à des protéines réceptrices à la surface de la membrane cellulaire. Les travaux portant sur l'isolement et la caractérisation de ces sites sont nombreux.

Allan et Crumpton (1973) ont utilisé des lymphocytes porcins de ganglions mésentériques, et de la PHA iodée pour tenter d'identifier ces protéines réceptrices. Ils ont incubé des lymphocytes avec la PHA-¹²⁵I sous des conditions correspondant à une stimulation optimale et sous des conditions où un excès de PHA (dix fois supérieure) était utilisé. Les complexes lectine-récepteur solubilisés au désoxycholate de sodium ont été chromatographiés sur une colonne de Sepharose 6B. Les lymphocytes incubés sous stimulation optimale montrent une protéine de 300 000 daltons et un coefficient de sédimentation de 9S. Dans le cas des lymphocytes incubés en présence d'un excès de PHA, on retrouve une protéine de 60 000 daltons. Ainsi, il semble que sous stimulation optimale, la liaison de la PHA se fasse sur des récepteurs de haute affinité alors que la majorité de la PHA, dans le cas d'un excès de lectine, est associée à des récepteurs membranaires de faible masse moléculaire, tels des glycolipides, ou à des récepteurs de faible affinité.

Henkart et Fisher (1975) ont iodé les protéines de surface de lymphocytes de sang humain par la technique de la lactoperoxidase,

solubilisé les cellules par traitement au NP-40 et purifié les complexes par immunoprécipitation au moyen d'anticorps anti-PHA. Les précipités ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Trois bandes de masse moléculaire 68 000, 53 000 et 43 000 daltons ont été observées aussi bien pour la PHA que pour la Con A. Les résultats ont été identiques dans le cas de lignées de lymphocytes T et B.

Alexander et ses collaborateurs (1978) ont séparé par électrophorèse des membranes de lymphocytes de ganglions de porc solubilisées avec SDS. Ils ont incubé ces bandes de gel directement avec de la PHA- 125 I. Plusieurs protéines, ayant des masses moléculaires variant de 10 000 à 200 000 daltons, lient la PHA: trois bandes majeures (117 000, 180 000 et 190 000 daltons), onze bandes moyennes et sept bandes mineures.

Skoog et al. (1980) ont étudié les récepteurs de lectines mitogéniques (PHA et leucoagglutinine (La)) et d'une lectine non-mitogénique (forme oxydée de La). Les récepteurs lymphocytaires ont été marqués in situ par la technique d'iodation catalysée par la lactoperoxydase ou par la technique utilisant la galactose oxydase et le borohydrure de sodium tritié. Les cellules marquées ont été solubilisées (NP-40), les protéines réceptrices éluées sur des colonnes Affi-Gel 10-lectine avec un tampon SDS et analysées sur gel SDS-PAGE. Les résultats ont montré la présence de quatre glycoprotéines majeures de masse moléculaire 120 000, 70 000, 60 000 et 43 000. Les différentes lectines (mitogéniques ou non) lient des protéines similaires indiquant que l'activation semble être initiée par un événement cellulaire séparé de la liaison.

Dillner-Centerlind et al. (1980) ont étudié la liaison de gly-

coprotéines à douze lectines dont la leucoagglutinine de Phaseolus vulgaris. Des lymphocytes T humains traités à la neuraminidase ont été marqués selon l'une ou l'autre des méthodes utilisées par Alexander et al. (1980), solubilisés par traitement avec le NP-40 et élués d'une colonne La-Sepharose avec une solution contenant du SDS. L'éluat a été analysé par gel SDS. L'autoradiographie a montré la présence de plusieurs bandes (seize) de masse moléculaire variant de 40 kilodaltons à 250 kilodaltons, mais trois bandes étaient plus intenses soient celles de 230, 175 et 125 kilodaltons.

Dupuis et Doucet (1981) et Dupuis et al. (1985) ont utilisé deux méthodes différentes pour étudier les composantes des lymphocytes spléniques porcins liant la PHA. La première méthode a impliqué la séparation de différentes fractions membranaires (membrane plasmique, réticulum endoplasmique et extrait NP-40 de cellules entières) par électrophorèse sur gel SDS sous conditions réductrices et non-réductrices. Ces bandes de gel ont été incubées avec de la PHA-I¹²⁵. Les résultats ont montré que la majorité des bandes liant la lectine sont communes aux trois fractions membranaires étudiées et se situent dans la partie supérieure des gels correspondant à des masses moléculaires de 75 à 250 kilodaltons. Au moins vingt-cinq à trente glycoprotéines de la membrane plasmique peuvent lier la PHA. La deuxième méthode a utilisé la chromatographie d'affinité. Un extrait NP-40 de lymphocytes a été chromatographié sur une colonne de Affi-Gel 10-PHA et élué à l'aide d'un tampon acide. Les éluats sont analysés par gel SDS-PAGE. L'éluat a montré la présence de neuf bandes majeures variant de 75 à 150 kilodaltons de masse moléculaire. Des tests d'inhibition d'attachement de la PHA-I¹²⁵ par la fraction étudiée (pH 3,0) ont montré que cette fraction inhibe l'attachement de la PHA aux sites de haute

affinité de la surface cellulaire des lymphocytes spléniques porcins (Dupuis et al., 1985). De plus, les glycoprotéines purifiées (fraction pH 3,0) diminuent la production d'interleukine-2 (IL-2) (dépendante de la PHA) par les lymphocytes porcins, tel que vérifié dans des essais avec des lignées de lymphocytes murins IL-2-dépendants (Dupuis et al., 1985).

Comme on peut le constater, les techniques couramment utilisées pour l'identification des récepteurs membranaires de lectines impliquent la solubilisation des composantes membranaires par divers détergents (SDS, NP-40, désoxycholate de sodium, Triton-X-100, etc...) ainsi que la purification par affinité. L'inconvénient majeur de ces méthodes est que, le dérangement de la structure membranaire par la solubilisation peut amener des altérations structurales du (des) récepteur(s) et ainsi la perte de l'affinité de liaison ou de la spécificité (Das et al., 1977). De plus, la solubilisation peut amener le démasquage de récepteurs "cryptiques", récepteurs ne pouvant être atteints in situ par la lectine (Jaffe et al., 1980). Une alternative intéressante pour contourner ces problèmes est celle d'utiliser des agents de réticulation chimique qui permettront un examen in situ des molécules impliquées dans l'interaction avec les lectines.

1.6 Les réactifs bifonctionnels

Les réactifs bifonctionnels sont de deux classes: les réactifs homobifonctionnels et les réactifs hétérobifonctionnels.

La première classe implique la présence de deux groupements réactifs identiques (X-X) séparés par une chaîne de longueur variable

(entre 5Å et 25Å) (fig.2). Dans les études des membranes plasmiques les réactifs porteurs de fonctions imidates et les esters de N-hydroxysuccinimide sont les plus utilisés. Les bis-imidates sont faciles à synthétiser, la longueur de la chaîne peut varier et ils sont hautement réactifs envers les groupements aminés des protéines. Plusieurs imidates sont perméables aux membranes. De plus, la plupart sont solubles dans l'eau et s'hydrolysent rapidement avec un temps de demi-vie de plusieurs minutes à environ une demi-heure, dépendant du pH (Ji, 1979). Les esters de N-hydroxysuccinimide réagissent principalement avec les groupements aminés des protéines pour former une liaison amide, mais aussi avec le groupe imidazole de l'histidine et le groupe sulfhydryle de la cystéine. Instables en milieu aqueux, ils ont une demi-vie de l'ordre de dix minutes à pH 8,5 et à 4°C et de plusieurs heures à pH 7,0 et 0°C.

Afin de simplifier l'analyse des résultats obtenus au moyen des réactifs homobifonctionnels chez des systèmes biologiques complexes, des liens clivables ont été introduits dans la partie séparant les deux fonctions chimiques. Ces réactifs clivables et l'utilisation de la technique diagonale de gels SDS-PAGE (Wang et Richards, 1974) ont beaucoup facilité l'analyse des résultats (Ji, 1979, Jaffe et al., 1980).

La deuxième classe de réactifs bifonctionnels comprend les réactifs ayant deux groupements réactifs non-identiques: un groupement photosensible et un groupement non-photosensible conventionnel tel un imidate ou un ester hydroxysuccinimide. C'est en étudiant la structure des membranes cellulaires par réticulation chimique, que l'utilité des réactifs hétérobifonctionnels photosensibles est apparue (Jaffe et al., 1980, Ji, 1979). Plusieurs problèmes potentiels avec les réactifs

Figure 2: STRUCTURES CHIMIQUES DE QUELQUES REACTIFS HOMO-
BIFONCTIONNELS

Réactif	Structure chimique
Diméthyl malonimide	$\text{CH}_3-\text{O}-\overset{\overset{+2\text{HN}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{CH}_2-\overset{\overset{\text{NH}_2^+}{\parallel}}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_3$
Diméthyl 3,3'-dithiobispropionimide	$\text{CH}_3-\text{O}-\overset{\overset{+2\text{HN}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\overset{\text{NH}_2^+}{\parallel}}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_3$
Tartryl di(glycidazide)	$\text{N}_3-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\overset{\overset{\text{OH}}{\mid}}{\text{CH}}-\overset{\overset{\text{OH}}{\mid}}{\text{CH}}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{N}_3$

homobifonctionnels ont pu être ainsi contournés: les réticulations causées par les collisions au hasard, le long temps de réaction, la difficulté du contrôle de la réaction et la réticulation non-sélective. Ces réactifs hétérobifonctionnels peuvent être classés en fonction de leur groupement photosensible, leur groupement non-photosensible et leur clivabilité. Deux types de dérivés peuvent être utilisés pour générer les groupements photosensibles (Bayley et Knowles, 1977, Ji, 1979) : le dérivé diazo méthyl cétone et le dérivé azido (fig.3). Le premier dérivé génère un carbène qui est hautement réactif avec les solvants sans discrimination, les liens C-H inertes et les groupements hydroxyles. Le second dérivé génère un nitrène. Le temps de demi-vie du nitrène est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-2} s. Ce sont surtout les dérivés aryl-nitrènes qui sont utilisés puisqu'ils sont moins susceptibles aux réarrangements internes que les alkyl-nitrènes. Les aryl-nitrènes possèdent une haute réactivité et une basse énergie d'activation. Ces dérivés sont photolysables à des longueurs d'onde entre 300 et 400 nm ce qui évite une irradiation pouvant causer des dommages aux protéines et aux acides nucléiques (Lwowski, 1980). La réactivité de la fonction nitrène est essentiellement indépendante de la température et ne nécessite pas de groupement réactif spécifique. La figure 4 montre plusieurs réactions possibles du nitrène généré par photolyse.

Les liens clivables introduits dans les réactifs hétérobifonctionnels sont de deux types: les liens disulfures et les groupements cis-glycols. Les liens disulfures sont clivés par réduction mais présentent le désavantage d'être susceptibles aux interchanges avec les groupements thiols des protéines étudiées. Cette étape peut par contre être contrôlée en utilisant un pH légèrement acide (6,0-6,5). De plus, l'utilisation de ces réactifs exclut l'usage d'agents réducteurs durant

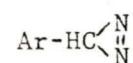
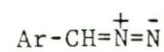
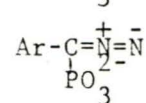
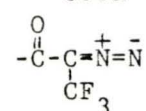
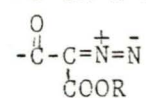
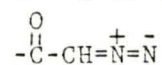
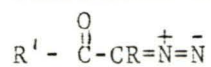
Figure 3: PRECURSEURS DE CARBENES ET DE NITRENES

PRECURSEURS DES CARBENES

REACTIF

 α -Diazokétones³ α -Diazoacetyl-^{3,5,6} α -Diazomalonyl-^{3,7}Trifluoromethyldiazoacetyl-⁸ α -Diazobenzylphosphonate⁹Aryldiazomethane³Aryldiazirine^{3,10}

STRUCTURES CHIMIQUES

PRECURSEURS DES NITRENES

REACTIF

Alkyl azides

Aryl azides

Nitroaryl azides

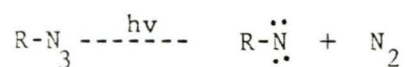
LONGUEUR D'ONDE
POUR LA PHOTOLYSE
(nm)

< 300

 \leq 300

> 300

Figure 4: REACTIONS POSSIBLES DU GROUPEMENT NITRENE GENERE
PAR PHOTOLYSE



- a) $\text{R}-\ddot{\text{N}} + \text{H}-\text{C} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \text{-----} \text{R}\ddot{\text{N}}\text{H} + \text{:C} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix}$ autres produits
abstraction d'hydrogène
- b) $\text{R}-\ddot{\text{N}} + \text{H}-\text{C} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \text{-----} \text{R}-\text{NH}-\text{C} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix}$ insertion à un C-H
- c) $\text{R}-\ddot{\text{N}} + \text{C} \equiv \text{C} \text{-----} \text{R}-\text{N} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix}$ addition
- d) $\text{R}-\ddot{\text{N}} + \text{R}-\ddot{\text{N}} \text{-----} \text{R}-\text{N}=\text{N}-\text{R}$ condensation
- e) $\text{R}-\ddot{\text{N}} + (\text{R}')_2\text{NH} \text{----} \text{R}-\text{NH}-\text{N} \begin{smallmatrix} \diagup \text{R}' \\ \diagdown \text{R}' \end{smallmatrix}$ insertion à un N-H
- f) $\text{R}-\ddot{\text{N}} \text{-----}$ produits de réarrangements

l'isolement des produits réticulés (Ji, 1979). Les groupements cis-glycols sont clivables par traitement au périodate de sodium (quatre à dix heures) et sont stables sous conditions réductrices. Mais les aldéhydes produits lors de la réaction présentent un désavantage car ils réagissent de façon intrinsèque (Ji, 1979). De plus, le traitement au périodate brise les liens glycols dans les résidus saccharidiques des glycoprotéines (Peters et Richards, 1977).

Récemment Schwartz (1985) a utilisé un nouveau type de lien clivable; le lien ester. Ce lien est très stable à pH neutre mais s'hydrolyse rapidement (environ une minute) en milieu basique. Le lien ester peut aussi s'hydrolyser lentement après photolyse du réactif photosensible le contenant (à pH neutre) mais les résultats les plus reproductibles sont obtenus en incluant aussi le traitement basique après la photolyse. Par contre, l'hydrolyse à pH neutre peut être avantageuse dans le cas d'expériences où le traitement basique n'est pas recommandé.

Les réactifs hétérobifonctionnels photosensibles sont utilisés dans des expériences de réticulation chimique des récepteurs membranaires avec des ligands. Le ligand est modifié par réaction avec le réactif et incubé avec les membranes ou les cellules. Le groupement photosensible est activé par photolyse et ainsi les ligands sont liés covalamment aux récepteurs. Les membranes sont solubilisées et analysées par électrophorèse (Ji, 1977, Ji, 1979, Kiehm et Ji, 1977, Schwartz et al., 1982). De plus, l'ajout d'un isotope radioactif au niveau de la membrane ou du ligand facilite l'analyse des résultats. Il est important de vérifier l'activité biologique de la protéine (ligand) après modification avec le réactif et suite à l'irradiation (Ji, 1979).

En conclusion, le choix d'un réactif idéal dépendra des conditions particulières de l'expérience et du but recherché. Il inclura plusieurs paramètres tels: la clivabilité, la photosensibilité, l'homo-vs-hétérobifonctionnalité, l'hydrophobicité ou l'hydrophilicité, la charge, la spécificité et les dimensions moléculaires du réactif (Ji, 1979).

1.7 But du travail

Le but du présent travail est la caractérisation partielle des sites de liaison de la PHA chez les lymphocytes spléniques porcins, en utilisant trois réactifs hétérobifonctionnels photosensibles. Ces réactifs sont le succinimido-6-N-(4-azidobenzyl)amino hexanoate, le succinimido-6-mercapto-S-(4-azidothiophényle) hexanoate et le 3-[(2-nitro-4-azidophényle)-2-aminoéthylthio]-N-succinimidyle propionate. Ces réactifs ont servi à modifier la phytohemagglutinine qui a été incubée avec les lymphocytes porcins. Les complexes récepteurs-PHA ont été solubilisés et analysés par électrophorèse sous différentes conditions.

Une seconde partie du travail a été celle de vérifier la possibilité que le(s) récepteur(s) de la PHA des lymphocytes spléniques porcins soient phosphorylés suite à la liaison de la PHA. Plusieurs récepteurs membranaires s'autophosphorylent suite à la liaison de leur ligand respectif et se sont principalement des récepteurs d'hormone de croissance; EGF, PDGF, insuline et IGF-1 (Czech, 1984, Hunter et Cooper, 1985). De même, un récepteur membranaire pour des glycoprotéines du sérum a été identifié comme étant une phosphoprotéine (Drickamer et Mamon, 1982). Puisque la PHA est connue pour induire la transforma-

tion lymphocytaire menant à la division cellulaire, l'hypothèse de travail a été celle que les récepteurs de la PHA puissent être phosphorylés, comme dans le cas des récepteurs de certaines hormones de croissance.

Des lymphocytes spléniques porcins ont été incubés en présence de ^{32}P , puis cultivés en présence de PHA sous conditions optimales de stimulation. Les cellules solubilisées ont été chromatographiées sur une colonne d'affinité Affi-Gel 10-PHA. Les éluats ont été analysés par électrophorèse SDS-PAGE.

2.0 MATERIEL ET METHODES

Les produits utilisés proviennent de Sigma Chemical Co. (St-Louis, Missouri), Fisher Scientific Limited (Montréal, Québec), Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wisconsin) et Canlab (Montréal, Québec).

Les milieux, antibiotiques et sérum utilisés pour l'isolement des cellules ont été achetés de Grand Island Biological Co. (Grand Island, New-York) et de Flow Laboratories Inc. (Montréal, Québec).

Les bactéries Staphylococcus aureus souche Cowan I proviennent de l'American Type Culture Collection (Rockville, Maryland) et les milieux utilisés pour leur croissance de Difco Laboratories (Detroit, Michigan)

Les supports pour les différentes chromatographies ont été obtenus de Bio-Rad (Richmond, California) ainsi que le matériel nécessaire aux gels d'électrophorèse.

Les anticorps monoclonaux anti-PHA ont été produits par le Dr. Brian Talbot du laboratoire des anticorps monoclonaux, Université de Sherbrooke.

Les produits radioactifs: NaI^{125} (IMS.30), $[\text{P}^{32}]$ -orthophosphate (PBS 13A) et $[\text{S}^{35}]$ -SNAP ont été obtenus de Amersham (Oakville, Ontario).

2.1 Isolement des lymphocytes spléniques porcins

Des rates de porc obtenues d'un abattoir local sont lavées avec de la saline (0,9% NaCl) supplée en sérum de veau foetal (1%) et en antibiotiques (pénicilline G, 10 000 U/ml et streptomycine, 10 mg/ml). Les organes sont ensuite déchiquetés au moyen d'un hachoir à viande manuel et le hachis est recueilli dans du milieu de Gey sans CaCl_2 (annexe) et tamponné à pH 7,3 avec de l'Hepes (39 mM). Le milieu contient également 1% de sérum de veau foetal et 1% d'antibiotiques. La suspension est filtrée sur de la mousseline. Le filtrat est centrifugé pendant huit minutes à 500xg. Deux lavages sont effectués avec le milieu de Gey. Les culots sont alors resuspendus (milieu de Gey) et la suspension est déposée délicatement sur un coussin de Ficoll 9%- Hypaque 50% (rapport 2,5:1). Après une centrifugation de vingt minutes à 300xg, les cellules -formant une interface brunâtre- sont recueillies ainsi que le surnageant se situant au dessus de l'interface. Les cellules sont de nouveau lavées par centrifugation (500xg, 8 minutes). Afin d'éliminer les érythrocytes résiduels, une lyse à l'aide de chlorure d'ammonium (NH_4Cl 140 mM, Tris-HCl 17 mM, pH 7,2) est faite dans un bain agitateur à 37°C pendant six minutes. La réaction est arrêtée en diluant avec trois volumes de milieu de Gey. Les cellules sont lavées deux fois par centrifugation (300xg, 3 minutes) et suspendues dans le milieu approprié aux expériences subséquentes après avoir été comptées (violet de Crystal). Le rendement de la préparation (1 rate de 170 g environ) est de $1-2 \times 10^9$ cellules, et la viabilité cellulaire (bleu de Trypan) est supérieure à 90 %.

2.2 Purification de la PHA

Nous utilisons de la phytohemagglutinine (PHA) extraite de haricots rouges (Phaseolus vulgaris), selon la méthode de Rigas et Osgood (1955), et purifiée par affinité sur une colonne de Sepharose-thyroglobuline (Felsted et al., 1975).

2.2.1 Couplage de la PHA à de l'Affi-Gel 10

La PHA est couplée à un support solide de Affi-Gel 10 suivant Doucet (1981) et Dupuis et al. (1985).

2.3.1 Culture des bactéries Staphylococcus aureus Cowan I

Les bactéries (ATCC 12598) sont inoculées selon Kessler (1975), dans un milieu antibiotique 3 (Difco) supplémenté (voir annexe), auquel on ajoute 40 mg/l de L-tryptophane et 100 mg/l de L-cystéine (Bundesen et Gordon, 1979). L'incubation se fait pendant 24 à 48 heures à 37°C sous agitation à l'aide d'un appareil "NBS gyrotory shaker".

2.3.2 Préparation des bactéries comme immunoadsorbant

La méthode de Kessler (1975) est utilisée. Les bactéries sont lavées par centrifugation dans du tampon PBS (150 mM NaCl, 40 mM phosphate, pH 7,2 contenant 0,05% NaN₃), resuspendues à une concentration de 10% (p/v) et fixées par traitement avec de la formaldéhyde (1,5%) sous agitation pendant 90 minutes à 23°C. Les bactéries sont lavées dans le tampon PBS puis tuées par une immersion rapide de l'erlenmeyer dans un bain à 80°C pendant cinq minutes. La suspension bactérienne est refroidie rapidement, lavée avec un tampon PBS et resuspendue à une concentration de 10% (p/v) dans le tampon PBS. Elle est gardée en fraction de deux millilitres à -70°C.

2.3.3 Isolement de la protéine A

La protéine A est isolée selon une combinaison des méthodes de Sjoquist et al. (1972) et Hjelm et al. (1972). Brièvement, la pâte bactérienne est resuspendue dans un tampon Tris-HCl 0,05M, NaCl 0,145M, pH 7,5 et placée dans un bain agitateur à 37°C. De la lysostaphine et de la DNase sont ajoutées et le progrès de la digestion est suivi en mesurant l'absorbance à 520 nm. Lorsque cette dernière est constante, la suspension bactérienne est centrifugée (4000xg, 10 minutes) à 4°C. Le pH du surnageant est amené à 3,5 par addition de HCl 5M et le précipité est éliminé par centrifugation. Le surnageant est neutralisé (pH 7,0) par addition de NaOH 5M puis filtré sur filtres Millipore. Le

filtrat est chromatographié sur une colonne d'immunoglobulines G liées à du Sepharose 4B. La protéine A est éluée à l'aide d'un tampon glycine-HCl 0,1M, pH 3,0 puis dialysée contre du tampon phosphate (0,1M, pH 7,0).

2.4.1 Phosphorylation des protéines membranaires de lymphocytes en présence de PHA

La mise en évidence de la phosphorylation des protéines membranaires de lymphocytes purifiés s'effectue selon le protocole de Chaplin et al. (1980). Les cellules sont lavées deux fois dans un tampon sans phosphate (PFB) puis incubées à 37°C pendant 60 minutes à une concentration de 25 ou 50 X 10⁶ cellules/ml dans du tampon PFB contenant 10% de sérum de veau foetal dialysé contre le même tampon. Les lymphocytes sont lavés par centrifugation, resuspendus dans du tampon PFB contenant 10% de sérum de veau foetal dialysé et on ajoute 0,25 mCi/ml de [³²P]-orthophosphate. On incube pendant vingt minutes à 37°C. On ajoute ensuite, la PHA à une concentration de 10 ou 50 ug/ml et les préparations sont incubées pendant dix minutes, trente minutes et une, cinq, seize, vingt et quarante heures. Des échantillons témoins ne contenant pas de lectine sont traités simultanément. Les cellules sont lavées à quatre reprises par centrifugation avec du tampon PFB contenant 10% de sérum de veau foetal dialysé et solubilisées par traitement au NP-40 de la façon suivante. Les culots cellulaires sont resuspendus dans du tampon (150 mM NaCl, 0,4 mM PMSF dans EtOH et 25 mM Tris-HCl à pH 7,4), puis on ajoute un volume égal du même tampon contenant 1% (v/v) de NP-40. Le mélange est gardé sur glace

pendant quinze minutes, puis centrifugé à 7000xg pendant trente minutes. Les surnageants sont conservés à 4°C.

2.4.2 Chromatographie des protéines phosphorylées sur colonne Affi-Gel

10-PHA

Chaque échantillon obtenu ci-haut est déposé sur une colonne d'Affi-Gel 10-PHA équilibrée avec NaCl 0,15M, CaCl₂ et MgSO₄ 0,001M, Hepes 0,01M et NaN₃ 0,02% pH 7,4. La colonne est éluée avec le même tampon jusqu'à ce que la radioactivité de l'éluat soit constante. On élue ensuite avec un tampon glycine-HCl à pH 3,0. L'éluat est recueilli soit tel quel ou neutralisé par dilution dans une solution Hepes 0,5M. Finalement, plusieurs millilitres de tampon "DTT" (tampon de régénération, 10% SDS, 20 mM DTT ajusté à pH 11,5) sont ajoutés à la colonne qui est laissée pour équilibrer pendant au moins une heure. On procède ensuite à l'élution avec le même tampon (DTT) et on recueille ou non dans une solution d'Hepes 0,5M. Les différents éluats (éluat glycine et éluat DTT) sont ensuite concentrés par précipitation à l'éthanol selon la technique de Barclay et al. (1976) ou par précipitation au TCA. La première méthode consiste à ajouter de l'éthanol jusqu'à une concentration finale de 75%, puis quelques gouttes d'acétate de sodium saturé, pour faciliter la floculation du précipité. Le mélange est placé à -20°C pendant 48 heures. Le précipité est ensuite lavé par centrifugation (1800xg, 30 minutes, à -10°C) avec de l'éthanol absolu et le surnageant est retiré par aspiration. La seconde méthode consiste à ajouter une solution de TCA (40%) jusqu'à une concentration finale de 10%, à 4°C, pendant une

période d'une heure. Une première centrifugation est faite pendant trente minutes (1800xg). Le précipité est lavé par centrifugation dans l'éthanol absolu (1800xg, 15 minutes). Le solvant résiduel est évaporé dans un dessiccateur à l'aide d'une pompe à vide.

2.4.3 Electrophorèse des échantillons radioactifs

Les différents échantillons sont resuspendus dans une solution de SDS 1% et préparés pour l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. La moitié de chaque échantillon est traitée sous conditions réductrices (Doucet, 1982) et l'autre sous conditions non-réductrices i.e. trois minutes à 100°C. Des protéines témoins commerciales (Pharmacia) sont traitées de la même façon. Finalement, avant de déposer les échantillons dans les puits, on ajoute à chacun d'eux une solution contenant du SDS 1%, sucrose 25%, bleu de Bromophénol 0,005%, Tris-HCl 0,313M à pH 6,8. Les gels sont préparés selon Laemmli (1970) et ont une épaisseur de 0,75 mm. Le gel séparateur contient 7,5% de polyacrylamide, et le gel concentrateur contient 4% de DATD. Le tampon d'électrophorèse est celui de Laemmli (1970). Un courant initial de 20 mA est maintenu constant jusqu'à ce que le front de migration (bleu de Bromophénol) ait pénétré d'une distance de un cm dans le gel séparateur. Le courant est ensuite maintenu constant à 30 mA par gel jusqu'à migration complète du colorant. Les gels sont refroidis au moyen d'un bain à circulation. La migration prend environ trois heures et demi. Les gels sont ensuite lavés avec de l'eau distillée puis placés pendant une nuit dans une solution de coloration au Bleu de Coomassie (0,2% Coomassie Brilliant Blue R-250 dans une solution de 25%

isopropanol, 10% acide acétique et 65% eau). Les gels sont ensuite décolorés (solution sans colorant) et placés entre deux plaques de verre scellées avec du ruban gommé afin de procéder à l'autoradiographie. Les films utilisés sont de marque Kodak XR-5. L'exposition varie de deux jours à deux semaines. Dans certains cas, la méthode de coloration des gels au nitrate d'argent ammoniacal (Wray et al., 1981) a été utilisée.

Pour certaines expériences, les bandes de gel sont ensuite découpées en tranches de 2 mm et comptées.

Après la coloration, dans le cas des gels où les protéines sont marquées avec le réactif [^{35}S]-SNAP, ils trempent dans une solution (trois fois le volume du gel) Enhance (New England Nuclear) pendant une heure sous une agitation douce. Ensuite, on précipite les agents de fluorographie dans le gel en ajoutant de l'eau froide et en agitant pendant une heure au maximum, jusqu'à ce que le gel revienne à sa taille initiale. Un papier filtre est glissé sous le gel et l'eau est aspiré. Finalement, le gel est séché à l'aide d'une pompe à vide et d'un appareil "Gel Dryer" de Bio-Rad. On expose directement sur un film sensible XR-5 et laisse à l'ultracongélateur.

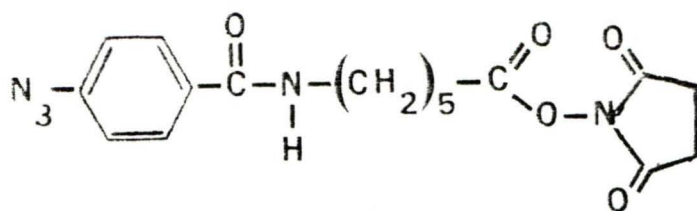
Pour les échantillons de protéines irradiées radioactives (section 2.8.0), il n'y a pas d'ajout de SDS puisque ceux-ci sont solubilisés avec du SDS de même pour les échantillons immunoprécipités.

2.5.0 Structures des réactifs hétérobifonctionnels utilisés

Dans cette étude, nous avons utilisé trois réactifs hétérobifonctionnels (figure 5). Deux de ces réactifs sont dérivés de l'acide

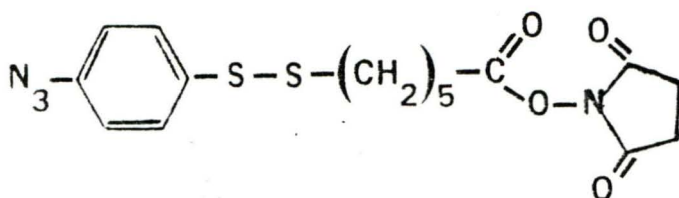
Figure 5: STRUCTURES DES TROIS REACTIFS HETEROBIFONCTIONNELS
UTILISES POUR LES MARQUAGES in situ DES RECEPTEURS DE
LA PHA

I



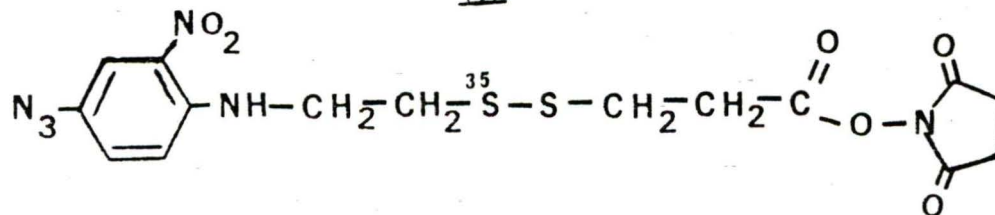
SUCCINIMIDO 6-N-(4-AZIDOBENZYL) AMINOHEXANOATE

II



SUCCINIMIDO-6-MERCAPTO-S-(4-AZIDOTHIOPHENYL) HEXANOATE

III



3-[2-NITRO(4-AZIDOPHENYL)-2-AMINOETHYLDITHIO]-N-SUCCINIMIDYL PROPIONATE

hexanoïque (Dupuis et Radwan, 1983). L'un de ces réactifs est le succinimido-6-N-(4-azidobenzyl)aminohexanoate (I), tandis que l'autre est le succinimido-6-mercapto-S-(4-azidothiophényl)hexanoate (II). Le réactif II possède une liaison disulfure clivable, tandis que dans le cas du réactif I, cette fonction est remplacée par un groupement amide. Le troisième réactif utilisé (III) est le 3-[(2-nitro-4-azidophényl)-2-aminoethyldithio]-N-succinimidyl propionate ($[^{35}\text{S}]$ -SNAP). Ce produit est marqué au soufre 35 dans la partie disulfure adjacente au groupement phénylazido (Schwartz et al., 1982).

2.6.0 Modification de la PHA avec les réactifs hétérobifonctionnels

2.6.1 Réactifs hétérobifonctionnels I et II

La PHA modifiée par les composés amide et disulfure est préparée selon le protocole de Radwan (1982, Dupuis et Radwan, 1983). La protéine concentrée à l'aide de polyéthylène glycol 15% (p/v) dans NaHCO_3 0,1M et NaCl 0,15M, est refroidie dans un bain de glace et le réactif dissout dans du THF est ajouté en cinq portions sur une période de trente minutes, sous agitation. La réaction s'effectue à 4°C et à l'obscurité. Le mélange réactionnel est ensuite déposé sur une colonne (1 cm X 50 cm) de filtration sur gel (Bio Gel P-2, 200-400 mesh) équilibrée avec un tampon PBS à pH 7,3 dans le cas du composé amide (I) et à pH 6,0 dans le cas du réactif disulfure (II). L'élution se fait avec les mêmes tampons, respectivement. Les fractions contenant la protéine modifiée (détection à 280 nm) sont mises ensemble et la concentration en protéines est déterminée. La PHA modifiée est conservée en solution

à 4°C à l'obscurité.

2.6.2 Composé hétérobifonctionnel [^{35}S]-SNAP (III)

Cette modification s'effectue selon les directives de Schwartz et al. (1982). Le composé radioactif est conservé dans du toluène. Le solvant est évaporé sous un jet d'azote puis le résidu est dissout dans du DMF distillé. La PHA (1 mg) dissoute dans du PBS (283 μl) est ajoutée au solide et le mélange est incubé pendant vingt minutes à la température de la pièce et à l'obscurité. La protéine modifiée (PHA-[^{35}S]-SNAP) est purifiée par élution sur une colonne (Bio Gel P-2) équilibrée avec du tampon PBS à pH 6,0. La PHA-[^{35}S]-SNAP est éluée avec le volume d'exclusion de la colonne. Un échantillon de 50 μl de chaque tube est mélangé avec du liquide à scintillation de Bray et compté au moyen d'un compteur bêta. De plus, la densité optique à 280 nm de chaque tube est mesurée. La concentration protéique est déterminée par la méthode de Lowry (1951).

2.7.0 Iodation de la PHA modifiée avec le réactif I ou II

La méthode utilisée est dérivée des travaux de Majorus et Brodie (1972). A une solution de PHA modifiée dans du tampon PBS à pH 7,3, on ajoute 100 à 300 μCi de Na^{125}I (Amersham) et la réaction est initiée par l'addition de chloramine-T (23 μl d'une solution 0,8%, par mg de PHA) en solution dans de l'eau dégazé. On laisse la réaction se poursuivre pendant deux minutes, puis on l'arrête par l'addition d'une

solution aqueuse fraîchement préparée de métabisulfite de sodium (36,3 μ l d'une solution 0,48%, par mg de protéine). La protéine radioactive modifiée est chromatographiée sur une colonne de Bio Gel P-2 équilibrée avec le tampon PBS correspondant (soit pH 7,3 ou pH 6,0, selon la protéine iodée). Les éluats correspondants à la PHA iodée sont rassemblés et la radioactivité spécifique est déterminée. Toutes ces étapes sont effectuées à l'obscurité. Les PHA modifiées et iodées sont conservées en solution tamponnée à 4°C. Le même mode opératoire est employé dans le cas de l'iodation de la PHA non-modifiée.

2.8.0 Expériences d'irradiation des complexes lymphocyte-PHA modifiée radioactive

Les lymphocytes spléniques porcins sont resuspendues dans du tampon de Gey, au pH approprié à la protéine modifiée radioactive utilisée (pH 7,3 ou pH 6,0). Les étapes suivantes s'effectuent à l'obscurité. Chaque tube contient 200×10^6 cellules dans un volume de un ml de tampon Gey. On ajoute 200 μ g de chaque échantillon de PHA modifiée radioactive et on incube pendant trente minutes à 37°C, sous agitation. Trois lavages sont ensuite effectués par centrifugation (150xg) pendant trois minutes. Les cellules sont ensuite resuspendues dans un ml de tampon Gey et transférées dans une bouteille (10 ml) à large ouverture et à fond plat, contenant un barreau magnétique micro. Les cellules sont irradiées au moyen d'une lampe ultraviolette placée à neuf cm au dessus des échantillons refroidis au moyen d'un courant d'air. L'expérience de photolyse dure pendant quinze minutes. On ajoute ensuite 200 μ g de PHA non-radioactive à chaque échantillon, on

laisse sous agitation pendant vingt minutes et on lave ensuite trois fois par centrifugation. Les échantillons sont ensuite suspendus dans 200 ul de tampon Gey.

2.8.1 Solubilisation des lymphocytes irradiés

Traitement au NP-40

A chaque échantillon de lymphocytes irradiés, on ajoute un volume de 200 ul de tampon Tris contenant 1% de NP-40 et également 2 ul de PMSF (50 uM en solution dans l'éthanol). On incube dans un bain de glace pendant quinze minutes. Le mélange est ensuite centrifugé à 7000xg pendant trente minutes. Les surnageants sont recueillis et conservés à 4°C.

Traitement au SDS

Les lymphocytes irradiés sont lysés suivant la méthode de Mann et al. (1969), laquelle utilise des cycles de gel/dégel consécutifs. Les cellules sont congelées dans l'azote liquide puis décongelées sous un courant d'eau chaude (quatre fois). On centrifuge ensuite à 450xg pendant dix minutes. Le surnageant est recueilli et traité avec du SDS à une concentration finale de 3% (p/v) pendant trois minutes à 100°C. L'extrait est conservé à 4°C.

2.8.2 Immunoprécipitations des échantillons solubilisés au NP-40

A chaque échantillon solubilisé au NP-40, on ajoute 500 ug (55 ul) d'anticorps monoclonaux anti-PHA (ascite 5H1) et on incube pendant une heure à 4°C, sous agitation rotatoire. On ajoute dix volumes d'une solution à 10% (dans le tampon PBS) de bactéries Staphylococcus aureus Cowan I fixées et on incube de nouveau pendant une heure à 4°C sous agitation. Des échantillons témoins contenant du sérum non immun et/ou des bactéries sont traités simultanément. Les échantillons sont centrifugés à 7000xg pendant trois minutes et lavés à trois reprises avec du tampon PBS contenant 0,05% NaN₃. Les culots sont resuspendus avec 120 ul d'une solution 4% SDS-6M urée, par agitation sur Vortex. Ces mélanges sont chauffés pendant trois minutes à 100°C. On centrifuge à 7000xg pendant cinq minutes et les surnageants sont conservés à 4°C (Kessler, 1975, Juliano et Li, 1978).

2.9.0 Iodation des protéines membranaires de lymphocytes purifiés

Nous utilisons la méthode de Chen et al. (1978). Des lymphocytes spléniques porcins purifiés (9×10^7 cellules ou plus) sont suspendus dans deux ml de tampon 1 (NaCl 78 mM, Na₂HPO₄ 57 mM, KH₂PO₄ 18 mM, pH 7,2) auquel on ajoute 11 mg de glucose et 250 ug de lactoperoxidase. On ajoute Na¹²⁵I (1 mCi) dilué avec le tampon de marquage 2 (NaCl 47 mM, Na₂HPO₄ 57 mM, KH₂PO₄ 18 mM, pH 7,2) et neutralisé avec HCl 1N. La réaction est initiée par l'addition de 150 mU de glucose oxidase (Sigma) et se poursuit pendant une période de

quinze minutes à la température de la pièce. La réaction est arrêtée à l'aide de trois lavages dans le tampon de marquage 2 par centrifugation à 150xg pendant trois minutes. Les cellules sont alors resuspendues dans le tampon approprié pour les expériences d'irradiation. Ces dernières sont effectuées selon le même protocole que celui décrit précédemment sauf que la PHA modifiée ajoutée n'est pas iodée.

2.10.0 Analyse des protéines irradiées radioactives par la technique diagonale

Cette technique dérive des travaux de Wang et Richards (1974). Une première électrophorèse est réalisée avec des échantillons solubilisés des expériences de marquage in situ des récepteurs de la PHA, traités sous conditions non-réductrices. L'électrophorèse terminée, le gel est déposé dans un plat de verre contenant de l'eau distillée le tout sur glace. On coupe la bande de gel désirée qui est ensuite délicatement déposée à l'aide d'une feuille de plastique sur le haut d'un second gel. Celui-ci consiste en: un gel séparateur de 13 cm ayant une épaisseur de 0,75 mm et une concentration en polyacrylamide de 7,5%, un gel concentrateur de 1,5 cm ayant une concentration de 4% en DATD puis finalement un gel "réducteur" de 2,5 cm d'agarose 1,5% (en solution dans le tampon d'électrode Tris-glycine) contenant 10% de 2-mercaptoéthanol et 1% de SDS. Pour faciliter le dépôt de la bande de gel sur la couche d'agarose, les premières pinces sont retirées de l'appareil et les plaques de verre sont légèrement écartées. La bande ainsi déposée, on ajoute encore de l'agarose pour faire contact entre les deux gels et on laisse gélifier en ayant soin de former un mince puits à côté de la bande afin d'y déposer un échantillon de protéines standards traité sous condition non-réductrice (standard précoloré de Bio-Rad). L'électrophorèse est réalisée au moyen du tampon de Laemmli (1970). On dépose quelques microlitres de solution de bleu de Bromophénol (section 2.4.3) au sommet du gel afin de suivre la migration des échantillons. L'électrophorèse s'effectue à un courant constant de 20 mA jusqu'à ce que le bleu de Bromophénol soit presque sorti du gel

réducteur (environ 0,5 cm). On arrête le courant pendant trente minutes puis on repart l'électrophorèse et maintient un courant constant de 30 mA jusqu'à la fin de la migration du bleu de Bromophénol. Le gel est déposé dans une solution fixatrice (tampon de décoloration) pendant une nuit et préparé pour l'autoradiographie tel que décrit en section 2.4.3.

2.11.0 Marquage des protéines à l'iode-125 après séparation sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

La méthode utilisée est dérivée des travaux de Elder et al. (1977). Le gel coloré dans une solution de bleu de Coomassie est décoloré, lavé avec de l'isopropanol 25% pendant trente minutes, puis avec du méthanol 10%. Le gel est transféré dans un sac en plastique contenant 75 ml de tampon phosphate (0,5 M, pH 7,5) auquel on ajoute 500 uCi de Na^{125}I (Amersham) et une solution de chloramine-T (concentration finale de 2%). Le sac est scellé et après quarante-cinq minutes d'incubation sous agitation lente, la réaction est arrêtée par addition de métabisulfite de sodium (concentration finale de 12,5%) pendant une période de quinze minutes. Le gel est rincé plusieurs fois avec le tampon phosphate puis trempé dans la solution de décoloration jusqu'à ce que la quantité de radioactivité libre soit faible. Le gel est trempé dans une solution d'acide acétique 7% contenant 2% à 3% de DMSO pendant une période de deux heures et séché à l'aide d'un "gel Dryer" (Bio-Rad) relié à une pompe à vide. L'autoradiographie est effectuée en exposant le gel séché à un film XR-5 (Kodak). Le film est laissé pendant différentes périodes de temps variant de un jour à deux semaines, à -70°C .

2.12.0 Etude de la liaison de la PHA-I¹²⁵ aux protéines séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Pour cette étude, les étapes suivies sont les mêmes que celles décrites par Dupuis et Doucet (1981). Brièvement, les gels sont fixés dans un mélange propanol:acide acétique:eau (5:2:13, v/v) puis ils sont lavés dans du tampon PBS. Chaque gel est placé dans un tampon PBS contenant de la PHA-¹²⁵I (3 mg) pendant vingt heures à la température de la pièce. La lectine non-liée est éliminée par plusieurs lavages avec du tampon PBS jusqu'à ce que la radioactivité atteigne un niveau minimal. Les gels sont ensuite préparés pour l'autoradiographie tel que décrit à la section 2.4.3.

3.0 RESULTATS

3.1.0 Etudes de phosphorylation

3.1.1 Chromatographie des échantillons de protéines lymphocytaires phosphorylées sur colonne d'Affi-Gel 10-PHA

Le tableau 1 montre les résultats obtenus en chromatographiant des solubilisats de lymphocytes stimulés pendant différentes périodes de temps avec de la PHA, sur une colonne Affi-Gel 10- PHA. L'éluat glycine réfère à la fraction obtenue en éluant les protéines liées avec du tampon glycine à pH 3,0 et l'éluat DTT réfère à la fraction obtenue en éluant les protéines liées avec un tampon DTT à pH 11,5 (voir section 2.4.2).

L'incorporation de ^{32}P maximale est observée avec un temps d'incubation de seize heures en absence de lectine. La phosphorylation obtenue avec des échantillons témoins (sans lectine) est dans tous les cas supérieure à celle obtenue dans le cas d'échantillons incubés avec la lectine.

3.1.2 Electrophorèse des solubilisats de lymphocytes phosphorylés et stimulés par la PHA, avant et après élution sur une colonne d'Affi-Gel 10-PHA

Tableau 1: RESULTATS DE L'ELUTION, SUR COLONNE D'AFFI-GEL 10-PHA,
DE SOLUBILISATS DE LYMPHOCYTES INCUBES EN PRESENCE D'OR-
THOPHOSPHATE [^{32}P] ET STIMULES PAR LA PHA.

L'éluat glycine réfère à l'échantillon obtenu en éluant
les protéines liées avec un tampon glycine (0,1 M) à pH
3,0 et l'éluat DTT réfère à l'échantillon obtenu en
éluant les protéines liées avec un tampon Hepes conte-
nant du DTT à pH 11,5.

CONDITIONS	TEMPS	ELUAT GLYCINE		ELUAT DTT	
		LECTINE	SANS LECTINE	LECTINE	SANS LECTINE
		cpm/15 ml éluat		cpm/15 ml éluat	
50X10 ⁶ cellules/ml + 10ug PHA	5 heures	1,64X10 ⁵	3,49X10 ⁵	12,8X10 ⁵	36,9X10 ⁵
	16 heures	2,35X10 ⁵	4,05X10 ⁵	15,2X10 ⁵	37,5X10 ⁵
	40 heures	1,01X10 ⁵	2,54X10 ⁵	12,0X10 ⁵	40,8X10 ⁵
50X10 ⁶ cellules/ml + 50 ug PHA	5 heures	0,30X10 ⁵	0,40X10 ⁵	1,83X10 ⁵	6,19X10 ⁵
	16 heures	2,54X10 ⁵	2,25X10 ⁵	7,02X10 ⁵	9,03X10 ⁵
	40 heures	0,22X10 ⁵	0,85X10 ⁵	0,46X10 ⁵	4,05X10 ⁵
		1,23X10 ⁵	0,88X10 ⁵	5,58X10 ⁵	8,76X10 ⁵

Des solubilisats de lymphocytes stimulés à la PHA et phosphorylés ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE sous conditions réductrices. Les bandes de gel obtenues ont été coupées en tranches de deux mm et comptées. Les résultats obtenus sont représentés à la figure 6. Huit bandes radioactives sont séparées et possèdent des masses moléculaires de 23-25, 31-33, 48, 64, 101, 158, 225 et 230 kilodaltons. La radioactivité associée à ces bandes est plus basse dans le cas des échantillons incubés en présence de la PHA. Des éluats (glycine et DTT) ont été concentrés et préparés pour électrophorèse sous conditions réductrices. Un autoradiogramme a révélé la présence d'une bande radioactive dans le bas du gel ayant une masse moléculaire de 23-25 kilodaltons pour l'éluat glycine et de 31-33 kilodaltons pour l'éluat DTT (résultats non montrés).

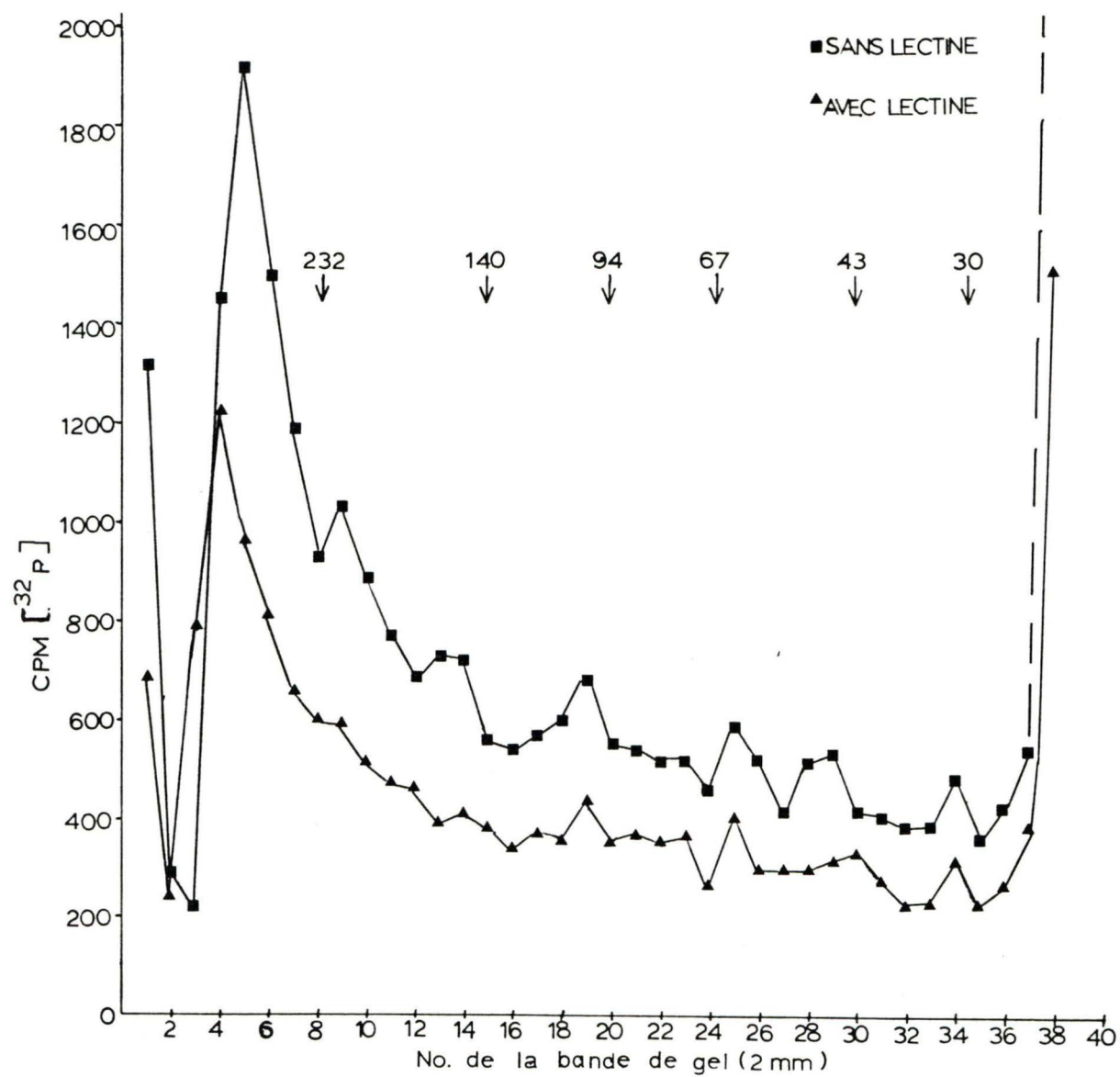
3.2.0 Marquage in situ par photoaffinité du (des) récepteur(s) de la PHA

3.2.1 Analyse des solubilisats de lymphocytes incubés avec PHAm-¹²⁵I-I ou PHAm-¹²⁵I-II et phosphorylés, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les lymphocytes spléniques porcins (200×10^6 cellules) ont été incubés simultanément avec de la PHA modifiée avec le réactif I et II radioactive à des quantités de 50 et 200 ug, photolysés puis solubilisés par traitement au NP-40. Les solubilisats lyophilisés ont été resuspendus dans du tampon d'électrode (Tris-glycine). Les protéines des différents échantillons ont ensuite été séparées par électro-

Figure 6: PATRON D'ELECTROPHORESE SUR GEL SDS-PAGE (CONDITIONS REDUCTRICES) DE SOLUBILISATS DE LYMPHOCYTES INCUBES AVEC ORTHOPHOSPHATE [^{32}P] ET STIMULES PAR LA PHA.

Des lymphocytes porcins (50×10^6 cellules/ml) ont été incubés dans un milieu contenant de l'ortho-phosphate [^{32}P] pendant seize heures en absence (-■-) et en présence (-▲-) de PHA (50 ug/ml) et solubilisés (NP-40). L'analyse a été faite par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en conditions réductrices. Les gels ont été coupés en tranches de 2 mm et comptés. Les flèches représentent les masses moléculaires des protéines standards en kilodaltons: catalase (232), lactate deshydrogénase (140) phosphorylase b (94), BSA (67), ovalbumine (43) et anhydrase carbonique (30).



phorèse sur gel SDS sous conditions réductrices et non réductrices. La figure 7 montre un profil représentatif des résultats obtenus par découpage du gel en bandelettes de deux mm. Le tableau 2 montre quantitativement les résultats d'une expérience similaire. Pour interpréter les résultats, nous avons procédé par soustraction de la masse moléculaire de monomères, dimères et trimères de PHA. En effet, une électrophorèse effectuée sur des échantillons de PHAm-¹²⁵I-I et PHAm-¹²⁵I-II photolysée a montré la présence principalement de monomères et de dimères et trimères en plus faibles quantités. Les complexes contenant plus de trois molécules de PHA ont été en très faibles quantités.

Les résultats ainsi analysés permettent de mettre en évidence des protéines réceptrices possédant des masses moléculaires de 50, 70, 100 et 155 kilodaltons.

3.2.2 Analyse de lymphocytes incubés avec de la PHAm-¹²⁵I-II, photolysés et solubilisés. L'électrophorèse a été faite par gel SDS-PAGE selon la technique diagonale et il y a eu réiodation des composants du gel obtenu

Les lymphocytes spléniques porcins (200×10^6 cellules) ont été incubés avec 100 ug de PHA-¹²⁵I modifiée avec le réactif II, photolysés puis solubilisés avec SDS. Les protéines des différents solubilisats ont été séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE selon la technique diagonale de Wang et Richards (1974). Une première autoradiographie a été effectuée puis les composants séparés ont été réiodés et radiographiés. La figure 8 est une représentation schématique à l'é-

Figure 7: ANALYSE ELECTROPHORETIQUE REPRESENTATIVE D'UN SOLUBILISAT
DE LYMPHOCYTES SPLENIQUES PORCINS INCUBES AVEC DE LA PHAm-
125-I-I ET PHOTOLYSES

Des lymphocytes porcins (200×10^6 cellules) ont été incubés avec de la PHAm-¹²⁵I-I, photolysés puis solubilisés (NP-40). Les solubilissats ont été analysés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE sous conditions non-réductrices. Le gel a été découpé en bandelettes de deux mm. Le Rf représente la migration relative des protéines par rapport au front du solvant et PM se réfère à la masse moléculaire. Les masses moléculaires (kilodaltons) de protéines témoins sont indiquées: thyroglobuline (330), catalase (232), lactate deshydrogénase (140), phosphorylase b (94), BSA (67) et ovalbumine (43)

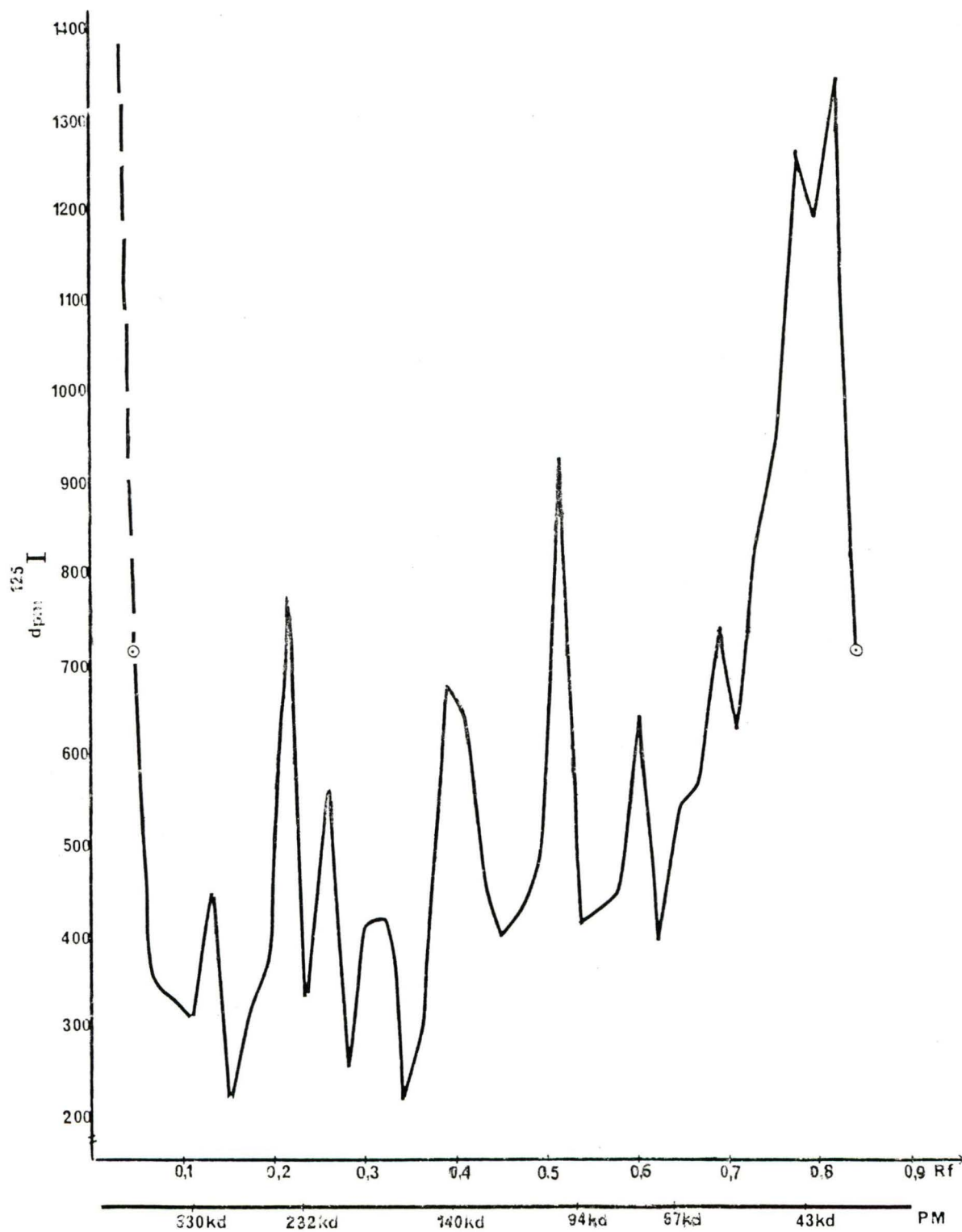


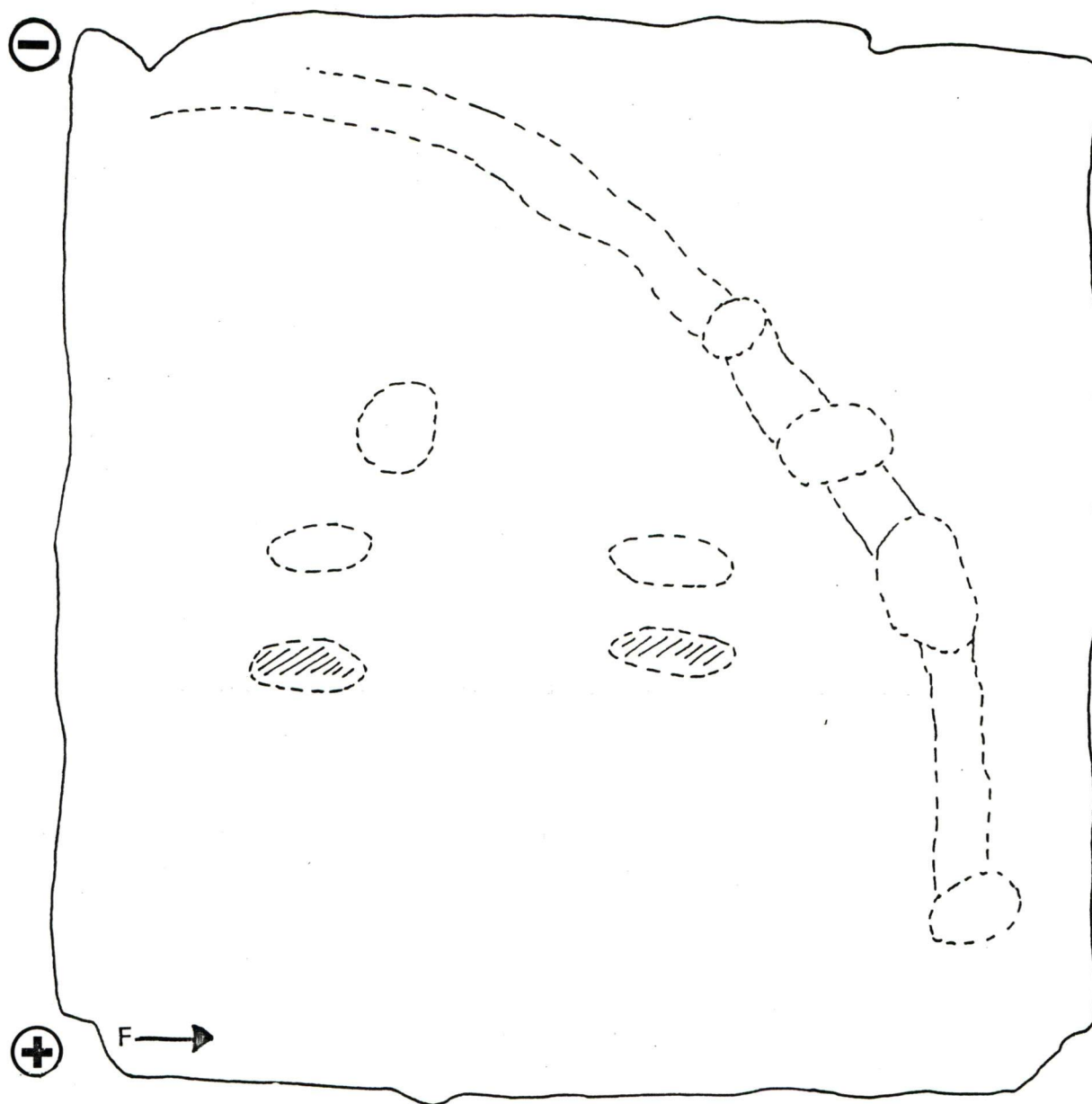
Tableau 2: RESULTATS QUANTITATIFS OBTENUS PAR ELECTROPHORESE SUR GEL
SDS-PAGE DE SOLUBILISATS DE LYMPHOCYTES INCUBES AVEC DE LA
PHAm- ^{125}I -I ET DE LA PHAm- ^{125}I -II ET PHOTOLYSES.

Des lymphocytes spléniques porcins (200×10^6 cellules) ont été incubés avec de la PHA- ^{125}I modifiée avec le réactif I (PHAm- ^{125}I -I) ou II (PHAm- ^{125}I -II) à des concentrations de 50 et 200 ug/ml, photolysés puis solubilisés (NP-40). Les solubilisats ont été séparés par électrophorèse (SDS-PAGE) sous conditions non-réductrices. Le gel a été découpé en tranches de deux mm et ces dernières ont été comptées.

BANDE Mr X 10 ⁻³	PHAm- ¹²⁵ I-(I)		PHAm- ¹²⁵ I-(II)	
	50 ug	200 ug	50 ug	200 ug
28-30 K	6600 dpm	8580 dpm	3665 dpm	5260 dpm
60 K	1860 dpm	4250 dpm	680 dpm	1440 dpm
75-80 K	935 dpm	2730 dpm	410 dpm	1315 dpm
86 K			290 dpm	1015 dpm
95-105 K	1360 dpm	1980 dpm	250 dpm	685 dpm
130 K	510 dpm	1450 dpm	245 dpm	625 dpm
158-163 K	370 dpm	1350 dpm	175 dpm	480 dpm
180-190 K	315 dpm	1110 dpm	125 dpm	440 dpm
208-215 K	305 dpm	1075 dpm	90 dpm	420dpm
230-250 K	350 dpm	885 dpm	155 dpm	395 dpm

Figure 8: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'AUTORADIOGRAMME OBTENU
SUITE A LA REIODATION DES COMPOSANTS DU GEL D'UNE ELEC-
TROPHORESE SDS-PAGE SELON LA TECHNIQUE DIAGONALE DE LYM-
PHOCYTES INCUBES AVEC DE LA PHAm- ^{125}I -II, PHOTOLYSES
ET SOLUBILISES.

Des lymphocytes porcins (200×10^6 cellules) ont été incubés avec de la PHAm- ^{125}I -II, photolysés puis solubilisés (SDS). Les solubilisats ont été analysés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE selon la technique diagonale. Un autoradiogramme du gel a d'abord été fait puis les composants du gel réiodés. Les bandes hachurées représentent la radioactivité détectée sur le premier autoradiogramme. Les trois autres bandes ont été mises en évidence après la réiodation des composants du gel. La diagonale obtenue est représentée en pointillé. La flèche situe le front de migration du colorant bleu de Bromophénol. La migration a été faite vers l'anode.



chelle des résultats obtenus. Sur la première autoradiographie, deux bandes protéiques radioactives sont visibles en dehors de la diagonale, toutes deux de 61-63 kilodaltons (hachurées sur le schéma). Suite à la réiodation du gel trois nouvelles bandes radioactives apparaissent en plus des deux précédentes ; deux bandes de 75-78 kilodaltons et une bande de 98 kilodaltons qui pourraient correspondre à des protéines de masses moléculaires de 185, 134 et 180 kilodaltons respectivement dans la première dimension (voir discussion).

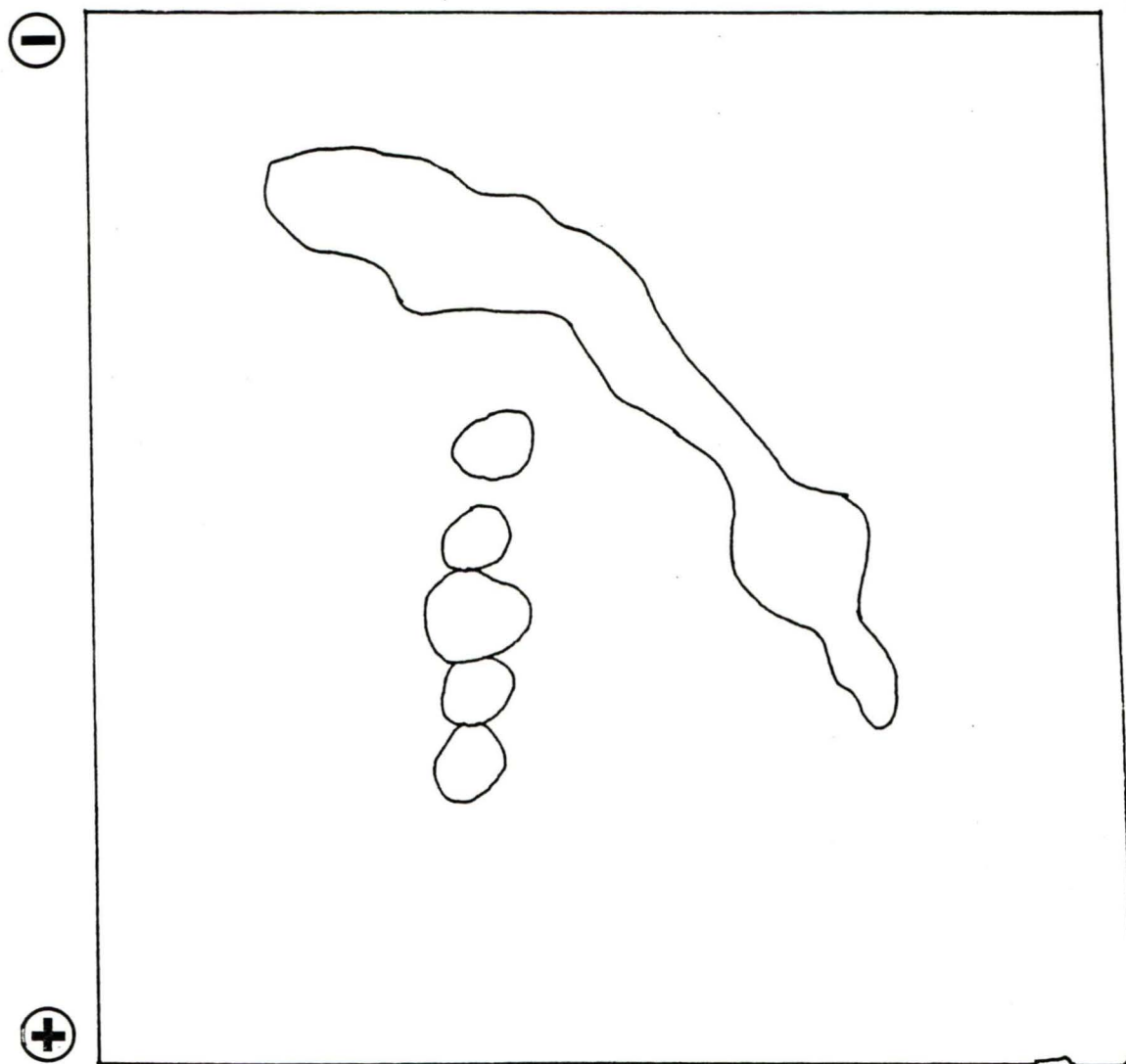
Un échantillon du solubilisé de la même expérience a été séparé par gel SDS en une seule dimension (sous conditions non réductrices) et la bande de gel a été analysée par autoradiographie. Plusieurs bandes radioactives ont été obtenues et ont des masses moléculaires de: 33, 65, 102, 126, 153, 165, 183 et 205 kilodaltons.

3.2.3 Mise en évidence des protéines séparées par électrophorèse et liant la PHA-¹²⁵I; les protéines proviennent de lymphocytes incubés avec de la PHAm-¹²⁵I-II et photolysés.

Les lymphocytes ont été incubés comme à la section 3.2.2, sauf que 200 ug de PHA-¹²⁵I modifiée avec le réactif II ont été utilisés. Le gel est coloré au bleu de Coomassie puis au nitrate d'argent. Finalement le gel a été incubé avec de la PHA-¹²⁵I et analysé par autoradiographie. L'autoradiogramme obtenu est schématisé à l'échelle à la figure 9. Suite à la coloration au bleu de Coomassie, trois bandes de masses moléculaires de 29, 42 et 63 kilodaltons ont été obtenues. Suite à la coloration au nitrate d'argent, deux bandes nouvelles de 51 et 85 kilodaltons ont été révélées. L'autoradiogramme montre que cinq ban-

Figure 9: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'AUTORADIOGRAMME OBTENU APRES INCUBATION, AVEC DE LA PHA- ^{125}I , DU GEL D'ELECTROPHORESE SDS-PAGE SELON LA TECHNIQUE DIAGONALE DE SOLUBILISATS DE LYMPHOCYTES INCUBES AVEC DE LA PHAm- ^{125}I -II ET PHOTOLYSES.

Les protéines du solubilisé de lymphocytes porcins (200×10^6) incubés avec de la PHAm- ^{125}I -II et photolysés ont été séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE selon la technique diagonale puis le gel a été incubé avec de la PHA- ^{125}I . La migration a été faite vers l'anode.



des radioactives de 29, 34, 40, 49 et 59 kilodaltons lient la PHA radioactive.

3.2.4 Autoradiogramme de lymphocytes incubés avec de la PHAm-III photolysés, solubilisés et analysés par SDS-PAGE

Les lymphocytes ont été incubés en présence de 200 ug de PHA modifiée avec le réactif III puis traités comme en 3.2.2. Les protéines du solubilisé ont été séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE sous conditions réductrices. Une autoradiographie montre la présence de trois bandes radioactives de 48, 65 et 74 kilodaltons (résultats non montrés). Des échantillons de la PHA modifiée avec le réactif III et radioactive ont été photolysés et analysés de la même façon. Deux bandes ont été retrouvées et ont des masses moléculaires de 35 et 37 kilodaltons sous conditions non réductrices et de 33 et 35 kilodaltons sous conditions réductrices. Ces bandes correspondent probablement aux sous-unités constitutives de la PHA.

3.2.5 Mise en évidence des récepteurs de la PHA à l'aide de lymphocytes radioiodés incubés avec de la PHAm-II, photolysés et solubilisés. Analyse des solubilisats par gel SDS-PAGE selon la technique diagonale.

Des lymphocytes ont été marqués avec de l'iode 125 (section 2.9.0) puis incubés en présence de 200 ug de PHA modifiée avec le réactif II. Les suspensions de lymphocytes ont ensuite été photolysés,

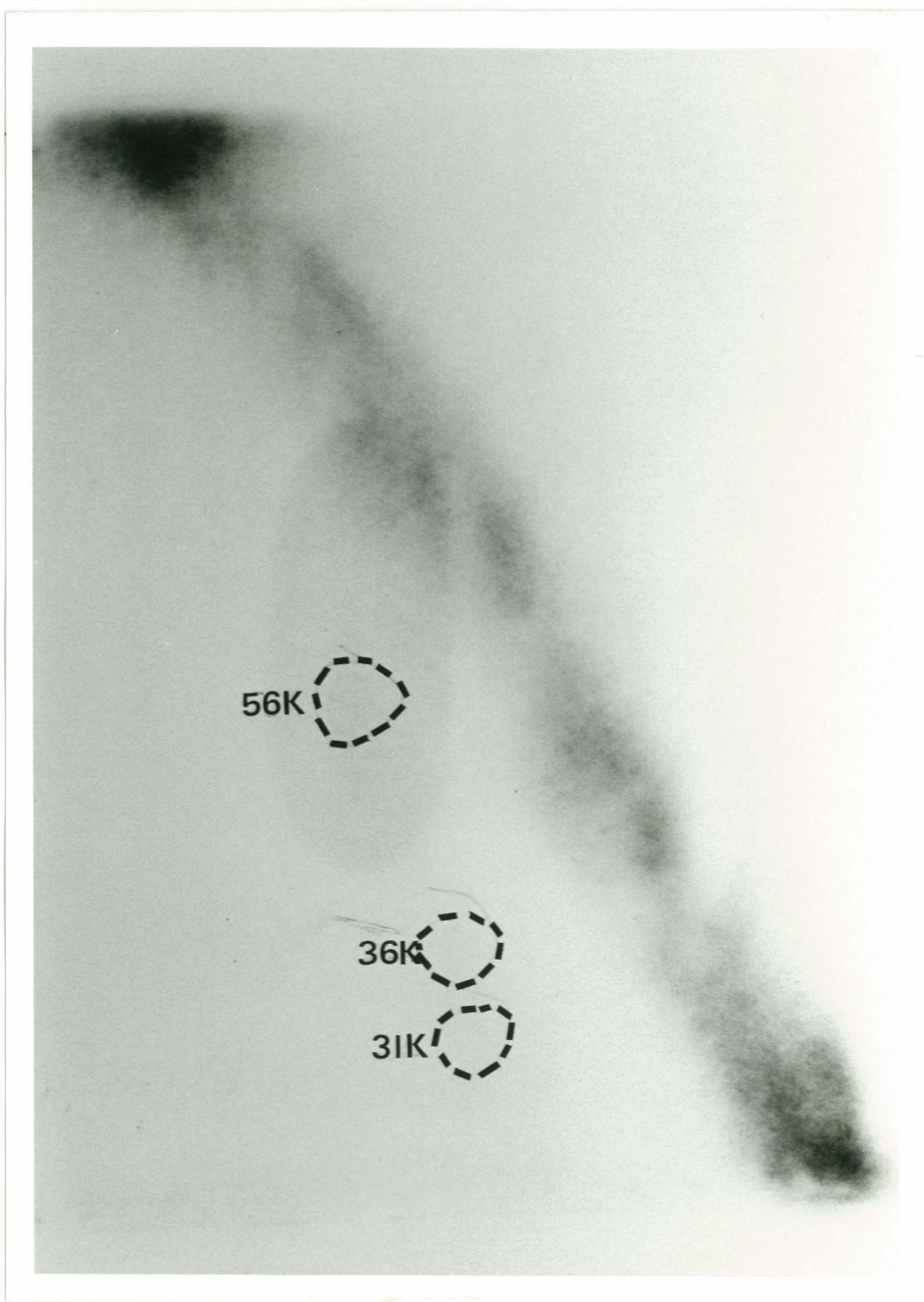
solubilisés au moyen du NP-40 et immunoprécipités avec des anticorps anti-PHA (section 2.8.2). L'immunoprécipité a été séparé par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en utilisant la technique diagonale. Trois "taches" radioactives (figure 10) de masses moléculaires de 31, 36 et 56 kilodaltons ont été observées.

Un échantillon de la même expérience a été analysé en une seule dimension et on retrouve plusieurs bandes radioactives ayant des masses moléculaires de 29, 47, 60, 73, 90, 108, 150, 180 et 205 kilodaltons.

Figure 10: AUTORADIOGRAMME D'UNE SEPARATION SUR GEL SDS SELON LA
TECHNIQUE DIAGONALE DES PROTEINES DU SOLUBILISAT OBTENU
APRES MARQUAGE DES LYMPHOCYTES A L'IODE 125, INCUBATION
DE CEUX-CI AVEC DE LA PHAm-II ET PHOTOLYSE

Les protéines membranaires de lymphocytes porcins (200×10^6) ont été marquées avec de l'iode 125 puis les lymphocytes ont été incubés avec de la PHAm-II, photolysés et solubilisés (NP-40). Les solubilisats ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE selon la technique diagonale. L'analyse des résultats a été faite par autoradiographie du gel. La migration a été faite vers l'anode.

①



②

4.0 DISCUSSION ET CONCLUSION

Les récepteurs de la PHA étant présents en faible quantité sur la surface cellulaire, il est nécessaire d'utiliser un tissu-source qui procure un nombre appréciable de lymphocytes. La rate de porc est dans ce contexte un organe de choix puisqu'il permet d'isoler entre un et deux milliards de cellules par rate tout en étant facile à obtenir. La technique utilisée est simple et exige peu de matériel.

4.1 Etude de la phosphorylation des protéines de lymphocytes spléniques porcins stimulés par la PHA

Plusieurs récepteurs membranaires, principalement ceux d'hormones de croissance, s'autophosphorylent suite à la liaison de leur ligand respectif. Puisque la PHA est connue pour son action mitogénique, nous avons tenté de vérifier si son (ses) récepteur(s) se phosphorylai(en)t suite à la liaison de la PHA. Une telle phosphorylation pourrait jouer un rôle majeur dans l'expression du signal mitogénique (Chaplin et al., 1980).

Chaplin et al. (1980) ont montré une augmentation rapide de la phosphorylation de plusieurs protéines de lymphocytes (entre 30 et 200 kilodaltons) suite à leur incubation en présence de PHA (1 ug à 40 ug/ml). L'incorporation maximale de phosphate radioactif (^{32}P) est observée après dix minutes.

A des temps de dix et trente minutes et à une concentration de 10 ug/ml de PHA, nous avons observé aucune phosphorylation de protéines retenues par une colonne d'Affi-Gel 10-PHA (tableau 1), laquelle retient les récepteurs de la lectine. En utilisant une dose plus élevée (50 ug) et plus de cellules (50×10^6 cellules/ml), on remarque la présence de protéines marquées et retenues sélectivement, mais seulement après des temps d'incubation supérieurs à cinq heures. Par contre, cette phosphorylation est plus élevée dans le cas des lymphocytes incubés en absence de lectine. Le tampon glycine permet d'éluer les glycoprotéines auxquelles se lie la PHA alors que le tampon Hepes contenant du DTT élue les composantes fortement retenues sur la colonne. On remarque que le maximum de radioactivité est recueilli lors de l'élution avec le tampon Hepes contenant du DTT.

L'étude par électrophorèse des différents éluats de la colonne Affi-Gel 10-PHA montre la présence de bandes radioactives de faibles masses moléculaires (23-25 et 31-33 kilodaltons). L'électrophorèse des solubilisats de cellules stimulées et phosphorylées montre la présence de bandes radioactives correspondant à des protéines de masses moléculaires se situant entre 23 et 230 kilodaltons tout comme Chaplin et al. (1980). Par contre, on ne peut affirmer que ces protéines phosphorylées soient identiques à celles observées par Chaplin et al. puisque le temps d'incubation de nos expériences (5 heures) est supérieur à celui utilisé (10 minutes) par cet auteur.

Il semble donc que les protéines phosphorylées retrouvées dans les éluats de la colonne d'affinité ne jouent pas un rôle dans les étapes initiales de la transformation lymphocytaire comme le suggèraient les résultats obtenus par Chaplin et al. puisqu'elles ne sont apparentes

qu'après un temps d'incubation prolongé.

4.2 Marquage in situ par photoaffinité du (des) récepteur(s) de la PHA

La chromatographie d'affinité et les extractions différentielles sont utilisées pour l'isolement et l'identification de récepteurs membranaires (Ji, 1977) à partir de tissu solubilisé. Les réactifs hétérobifonctionnels photosensibles permettent l'isolement de ces récepteurs in situ.

Ces réactifs ont l'avantage d'éliminer en partie le problème de la multiplicité des produits réticulés puisque la réaction peut être contrôlée. De plus, la réaction se fait dans les conditions physiologiques de la cellule, ceci permettant d'éliminer les fausses interprétations dues à de la dégradation ou à une perte d'activité biologique du récepteur lors de la solubilisation. Finalement, si le réactif est clivable, l'analyse peut être simplifiée encore plus à l'aide d'électrophorèse sur gel utilisant la technique diagonale. Plusieurs auteurs ont utilisé ces différents avantages pour la caractérisation de récepteur (Das et al., 1977, Ji, 1977, Jaffe et al., 1980, Schwartz et al., 1982, Schwartz, 1985).

Dans ce travail, nous avons utilisé trois réactifs différents dont deux clivables via des liens disulfures. La méthode de marquage a été la même dans tous les cas, seule la méthode d'analyse des résultats différait d'une expérience à l'autre. Le tableau 3 montre un résumé des résultats obtenus avec les différentes méthodes d'analyse utilisées.

La première méthode (3.2.1) a été l'électrophorèse sur gel SDS-PAGE

Tableau 3: RESUME DES RESULTATS OBTENUS PAR MARQUAGE in situ DES
RECEPTEURS DE LA PHA ET MISE EN EVIDENCE DES PROTEINES
RECEPTRICES SELON DIFFERENTES METHODES D'ANALYSE.

Les résultats obtenus proviennent d'électrophorèse sous
conditions réductrices à l'exception du premier résultat
(section 3.2.1) tel qu'indiqué entre parenthèses.

METHODES D'ANALYSE UTILISEES	MASSE MOLECULAIRE DES RECEPTEURS MIS EN EVIDENCE (kilodaltons) (conditions réductrices)
Electrophorèse sur gel SDS-PAGE en une dimension (section 3.2.1)	50, 70, 100, 155 (cond. non-réductrices)
Gel SDS-PAGE selon la technique diagonale et réiodation du gel (section 3.2.2)	75-78
Gel SDS-PAGE selon la technique diagonale et incubation du gel avec de la PHA- ¹²⁵ I (section 3.2.3)	29, 34, 40, 49 et 59
Marquage avec de la PHAm-III et gel SDS-PAGE en une dimension (section 3.2.4)	48, 65 et 74
Lymphocytes radioiodés avec de l'iode ¹²⁵ , incubation avec de la PHAm-II et gel SDS selon la technique diagonale (section 3.2.5)	31, 36 et 56

en une dimension (conditions non-réductrices) des solubilisats de lymphocytes incubés en présence de PHAm-¹²⁵I-I et de PHAm-¹²⁵I-II et photolysés. Le gel obtenu a été coupé en bandelettes de deux mm et ces bandelettes ont été comptées. Le patron obtenu (figure 7) est complexe et difficile à analyser. L'interprétation des résultats est faite en tenant compte de la présence de monomère, dimère et trimère de PHA (28-30, 60, 86 kilodaltons) et nous avons procédé par soustraction. Les résultats ainsi obtenus (tableau 2) permettent de mettre en évidence des protéines de masses moléculaires de 50, 70, 100 et 155 kilodaltons, lesquelles pourraient représenter les récepteurs lymphocytaires de la PHA. Notons que cette méthode est indirecte et peut amener plusieurs erreurs.

Par contre, on constate une analogie de nos résultats avec les résultats obtenus par Dupuis et al. (1985). Ces auteurs ont solubilisé des lymphocytes à l'aide du NP-40 et ont purifié les solubilisats par chromatographie d'affinité sur une colonne d'Affi-Gel 10-PHA. Les glycoprotéines retenues ont été éluées avec un tampon glycine à pH 3,0 et analysées par électrophorèse SDS-PAGE. Les résultats montrent la présence de plusieurs bandes majeures, positives au bleu de Coomassie, bandes ayant des masses moléculaires de 50-55, 75, 95, 130 et 155 kilodaltons ainsi que plusieurs bandes mineures de 20-40, 42, 45, 60-65, 175 et 200-250 kilodaltons.

Allan et Crumpton (1973) utilisant de la PHA-¹²⁵I et des lymphocytes porcins de ganglions ont mis en évidence une protéine réceptrice de 60 000 daltons dans le cas d'une incubation avec un excès de PHA. Alors qu'Alexander et al. (1978) obtenaient plusieurs bandes en utilisant une méthodologie similaire à la nôtre, sans toutefois utiliser des agents de réticulation. Trois bandes majeures se

situaient à des masses moléculaires de 117 000, 180 000 et 190 000 daltons, par contre les bandes d'intensité moyennes retrouvées se situaient à 29 ,32, 41, 58, 64, 93 et plusieurs à plus de 100 kilodaltons.

Les récepteurs de PHA ont également été analysés par la technique diagonale. Dans ce cas, les lymphocytes ont été incubés avec de la PHAm-¹²⁵I-II, photolysés et solubilisés. Les solubilisats ont été analysés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE selon la technique diagonale (autoradiographie). La mise en évidence des récepteurs a été faite après iodation des composantes du gel, in situ (3.2.2).

Les résultats montrent la présence de deux bandes radioactives de 61-63 kilodaltons lors de la première autoradiographie, ces bandes correspondraient bien à des dimères de PHA. Suite à la réiodation trois nouvelles bandes apparaissent, deux de 75-78 kilodaltons et une de 98 kilodaltons (figure 8). On remarque que la bande de 98 kilodaltons ne correspond à aucune bande radioactive présente lors de la première autoradiographie et de ce fait ne doit pas représenter un récepteur mais plutôt une protéine contaminante de la membrane non reliée à la PHA mais possédant un lien clivable.

A l'examen de ces résultats, on remarque aussi que la somme des masses moléculaires des deux paires de bandes radioactives donnent environ 134 et 195 kilodaltons en assumant qu'une protéine réceptrice de 75-78 kilodaltons lie un à deux dimères de PHA respectivement. La position de ces protéines au niveau de la diagonale vérifie la possibilité d'une telle hypothèse. La possibilité d'avoir un récepteur de PHA ayant une masse moléculaire approximative de 70 kilodaltons avait aussi été remarquée avec les travaux de Dupuis et al. (1985) et lors de l'expérience détaillée à la section 3.2.1 laquelle utilisait

une électrophorèse sous conditions non-réductrices de solubilisats de lymphocytes.

Nous avons aussi utilisé une technique additionnelle afin d'analyser les récepteurs de la PHA. Dans ces expériences, les lymphocytes ont été incubés avec de la PHAm- ^{125}I -II, photolysés puis solubilisés. Les protéines des solubilisats ont été séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en utilisant la technique diagonale. Par contre, le gel a été incubé avec de la PHA- ^{125}I dans le but de mettre en évidence les protéines liant la PHA. Cinq bandes radioactives ont été obtenues: 29, 34, 40, 49 et 59 kilodaltons (figure 9). Quatre de ces bandes ont pu être visualisées soit par coloration au bleu de Coomassie, soit par coloration au nitrate d'argent. De nouveau on retrouve des bandes ayant une masse moléculaire approximative de 50 kilodaltons et 60 kilodaltons (tableau 3).

Par contre, la présence de bandes radioactives de 29, 34 et 40 kilodaltons est inattendue. Ces bandes pourraient représenter des monomères de PHA ou des récepteurs de faibles masses moléculaires. Une coloration au bleu de Coomassie d'une expérience similaire nous montre aussi la présence d'une bande de 56 kilodaltons (résultats non montrés) hors de la diagonale.

Le réactif de Schwartz utilisé en 3.2.4 présente un avantage certain puisque le marquage radioisotopique se situe au niveau du lien clivable ce qui entraîne que le récepteur après clivage est marqué et donc que l'analyse du résultat est directe. Une électrophorèse en une dimension sous conditions réductrices nous permet de visualiser la présence de protéines réceptrices radioactives.

Des bandes radioactives de 48, 65 et 74 kilodaltons ont été obte-

nues (résultat non-montré) avec cette méthode et ceci concorde assez bien avec les résultats obtenus lors des expériences précédentes, utilisant les autres méthodes.

Une autre méthode a été utilisée pour mettre en évidence les récepteurs de la PHA. Dans ce cas, les protéines membranaires de lymphocytes ont été marquées à l'aide d'iode 125, ces cellules ont été incubées avec de la PHAm-II, photolysées puis solubilisées. Les solubilisats ont été analysés par gel SDS-PAGE selon la technique diagonale après avoir été immunoprécipités à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-PHA.

Les résultats ont montré la présence de trois bandes radioactives situées en dehors de la diagonale (figure 10), soient à 31, 36 et 56 kilodaltons. Ce résultat corrobore aussi les résultats antérieurs. Si on assume que ces récepteurs ont lié des dimères de PHA, la somme des masses moléculaires seraient de 91, 96 et 116 kilodaltons respectivement, alors que la position de ces protéines par rapport à la diagonale nous montre la possibilité d'avoir des sommes de 78, 80 et 108 kilodaltons respectivement, ce qui est assez rapproché des résultats trouvés.

La présence de bandes de faibles masses moléculaires ne représentant pas de la PHA nous amène à penser que les bandes de faibles masses moléculaires obtenues à la figure 9 pourraient représenter des récepteurs spécifiques de PHA. L'immunoprécipitation permet aussi d'éliminer certaines protéines du solubilisé et ainsi de simplifier un peu l'analyse des résultats.

D'autres auteurs ont utilisé le marquage des cellules pour mettre en évidence des protéines réceptrices. Henkart et Fisher (1975) ont marqué des lymphocytes sanguins humains puis les ont incubé avec des

anticorps anti-PHA. Ces auteurs ont obtenu des bandes sur gel SDS à 43, 53 et 68 kilodaltons. Skoog et al. (1980) ont solubilisé leurs cellules marquées et les ont déposés sur une colonne AffiGel 10-PHA, l'élution permettait de mettre en évidence des protéines de 43, 60, 70 et 120 kilodaltons. Finalement, Dillner-Centerlind et al. (1980) ont utilisé la même technique que Skoog et al. (1980) i.e. marquage de la cellule et chromatographie d'affinité et obtiennent seize bandes dont les masses moléculaires variaient de 40 à 250 kilodaltons, les bandes les plus intenses se situant à 125, 175 et 230 kilodaltons.

On remarque en examinant le tableau 3 l'absence de protéines de masses moléculaires de plus de 80 kilodaltons, ceci peut être due à la concentration de polyacrylamide utilisée ne permettant pas une très haute résolution à des masses moléculaires plus élevées que 125 kilodaltons. Il faut noter aussi que la concentration de PHA utilisée dans ces essais correspond à une saturation complète des sites récepteurs (basse et haute affinité).

Des expériences témoins ont aussi été faites en incubant, préalablement à la liaison, des lymphocytes avec de la PHA, puis les expériences ont été effectuées tel que décrit précédemment. Les autoradiogrammes obtenus ne montraient aucune bande radioactive en dehors de la diagonale suite à des expositions de plus de deux semaines. La spécificité du réactif semble donc assez bonne.

Récemment, certains auteurs (Leca et al., 1986, Amiot et al., 1986) ont montré l'existence d'autres protéines ayant des propriétés diverses mais pouvant aussi lier la PHA. Ainsi, un complexe glycoprotéinique humain exprimés sur les cellules haématopoïtiques primaires telles les cellules T et les monocytes, reconnu par les anticorps monoclonaux K20, peut lier la PHA à la surface des cellules T normales. Ce complexe est

formé d'une sous-unité constante de 120-140 000 daltons associée non covalamment à la surface cellulaire par des sous-unités de masses moléculaires élevées variant de 150 à 200 000 daltons sur différents types cellulaires (Amiot et al., 1986). De plus, la PHA reconnaît le complexe Ti-CD3 comprenant le récepteur des antigènes de cellules T (Ti) un hétérodimère de 90 000 daltons lié par un lien disulfure, et la molécule CD3 monomorphique associée non covalamment. Ce complexe est la molécule de surface capable d'induire l'activation des cellules T. Cette interaction de la PHA implique les deux chaînes du récepteur i.e. la chaîne alpha et la chaîne beta. La PHA se lie aussi avec le complexe CD2 qui est la glycoprotéine liant les érythrocytes de mouton, ce complexe étant distinct du complexe Ti-CD3.

On constate donc que nos résultats semblent suivre ceux d'autres auteurs tout en utilisant des techniques variées. L'utilisation des agents de réticulation nous apporte de plus l'avantage de travailler in situ. Par contre, il serait souhaitable d'effectuer ces essais d'isolement et de caractérisation sur une population homogène de cellules T au lieu d'un mélange de cellules B et T. On sait que seules les cellules T sont responsables de l'action mitogénique associée à la liaison de PHA alors que les cellules B possèdent aussi des sites de liaison de la PHA, bien que ces cellules ne répondent pas à la PHA.

Le réactif hétérobifonctionnel photosensible idéal porterait un isotope radioactif au niveau du noyau aromatique et serait clivable. Il suffirait de lier ce réactif à la PHA et d'effectuer une expérience de marquage similaire à celles effectuées dans ce mémoire, le résultat serait directement visible après une électrophorèse en une dimension sous conditions réduites. Pour clarifier la réponse une immunoprécipitation serait souhaitable avant de déposer les solubilisats sur gel.

Un tel réactif a été synthétisé par Schwartz (1985) et pourrait sans doute aider à apporter une réponse favorable au problème de la caractérisation des récepteurs de la PHA impliqués dans la réponse mitogénique.

5.0 ANNEXECOMPOSITION DE CERTAINS TAMPONS ET MILIEUX

Tampon de Gey modifié:	NaCl	120,0 mM	
	KCl	5,0 mM	
	Na ₂ HPO ₄ 7·H ₂ O	0,86mM	
	KH ₂ PO ₄	0,22mM	
	MgSO ₄ 7·H ₂ O	0,28mM	pH 7,3
	MgCl ₂ 6·H ₂ O	1,0 mM	
	glucose	5,6 mM	
	Hepes	39,0 mM	

Milieu Penassay (milieu antibiotique 3 supplémenté)

milieu antibiotique 3	17,5 g/l
Casitone	5,0 g/l
extrait de levure	2,5 g/l
β -glycérophosphate	2,5 g/l
niacine	4 mg/l
thiamine-HCl	2 mg/l

Tampon PFB: NaCl	140,0 mM
KCl	5,4 mM
CaCl ₂	1,8 mM

MgSO ₄	0,8 mM
glucose	5,5 mM
Tris-HCl	20,0 mM

pH 7,35

Tampon de régénération

de la colonne Affi-Gel 10-PHA: NaCl	150,0 mM
CaCl ₂	1,0 mM
MgSO ₄	1,0 mM
NaN ₃	0,02 %
Hepes	10,0 mM

pH 7,4

REMERCIEMENTS

Pour terminer ce travail, j'aimerais remercier:

Le Dr. Gilles Dupuis, mon directeur de recherches pour avoir orienté ce travail et pour m'avoir continuellement soutenu et encouragé.

Dr. David Gibson qui nous a aimablement fourni les immunoglobulines G.

Dr. Brian Talbot pour la préparation des anticorps monoclonaux anti-PHA.

Les Drs. Emmanuel Escher et Jean-Guy Lehoux pour avoir accepté de juger ce mémoire.

Tous mes camarades et membres du laboratoire ainsi que ceux et celles du Département de Biochimie pour leur présence et leur aide.

Micheline Poulin et Gisèle Caron pour le prêt de leurs ordinateurs.

Aussi et surtout mes camarades de travail qui m'ont encouragé lors de la rédaction quand le coeur n'y était pas!

Finalement, André pour son aide morale et ses nombreuses veillées passées seul sans critiquer.

BIBLIOGRAPHIE

- Alexander, S.S., L.R. Livingstone, L.D. Yates and H.J. Sage (1978) The binding of lectins to components of plasma membranes from porcine submaxillary lymph node lymphocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 512, 350-364.
- Allan, D., J. Auger and M.J. Crumpton (1971) Interaction of phytohemagglutinin with plasma membranes of pig lymphocytes and thymus cells, *Exptl. Cell Res.*, 66, 362-368.
- Allan, D. and M.J. Crumpton (1973) Phytohemagglutinin-lymphocyte interaction. Characterization of binding sites on pig lymphocytes for ^{125}I -labelled phytohemagglutinin, *Exptl. Cell Res.*, 78, 271-278.
- Amiot, M., A. Bernard, H.C. Tran, G. Leca, J.M. Kanellopoulos and L. Boumsell (1986) The human cell surface glycoprotein complex (gp 120,200) recognized by monoclonal antibody K20 is a component binding to phytohaemagglutinin on T cells, *Scand. J. Immunol.*, 23, 109-118.
- Andersson, J., G.M. Edelman, G. Moller and O. Sjokerg (1972) Activation of B-lymphocytes by locally concentrated concanavalin A, *Eur. J. Immunol.*, 2, 233-235.
- Andersson, J. and F. Melchers (1973) Induction of immunoglobulin M synthesis and secretion in bone-marrow-derived lymphocytes by locally concentrated concanavalin A, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 416-420.
- Barclay, A.N., M. Letarte-Muirhead, A.F. Williams and R.A. Faulkes (1976) Chemical characterization of the Thy-1 glycoproteins

- from the membranes of rat thymocytes and brain, *Nature*, 263, 563.
- Bayley, H. and J.R. Knowles (1977) Photoaffinity labeling, *Methods in Enzymology*, 46, 69-114.
- Bird, G.W.G. (1959) Haemagglutinins in seeds, *Brit. Med. Bull.*, 15, 165-168.
- Bonnard, G.D., K. Yosaka, D. Jacobson, R.L. Fine, D.A. Morgan and R.B. Herberman. Source and functional characteristics of the mitogenic factor inducing continued proliferation of human T cells. *Proceedings of the 12th leucocyte culture conference*, M.R. Quastel ed., Academic Press, New-York, (1979), 569-573.
- Borberg, H., I. Yesner, B. Gesner and R. Silber (1968) The effect of N-acetyl-D-galactosamine and other sugars on the mitogenic activity and attachment of PHA to tonsil cells, *Blood*, 31, 747-757.
- Boyd, W.C. (1970) Lectins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 169, 168-190.
- Boyd, W.C. and R.M. Reguera (1949) Hemagglutinating substances for human cells in various plants, *J. Immunol.*, 62, 333-339.
- Bundesen, P.G. and J. Gordon (1979) Cell separation with staphylococcal protein A immunoadsorbent surfaces, *J. Immunol. Methods*, 30, 179-193.
- Byus, C.V., G.R. Klimpel, D.O. Lucas and D.H. Russel (1977) Type I and type II cyclic AMP-dependent protein kinase as opposite effectors of lymphocyte mitogenesis, *Nature*, 268, 63-64.
- Chaplin, D.D., H.J. Wedner and C.W. Parker (1979) Protein phosphorylation in human peripheral blood lymphocytes. Subcellular distribution and partial characterization of adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase,

- Biochem. J. , 182, 525-536.
- Chaplin, D.D., H.J. Wedner and C.W. Parker (1980) Protein phosphorylation in human peripheral blood lymphocytes: mitogen-induced increases in protein phosphorylation in intact lymphocytes, J. Immunol., 124, 2390-2398.
- Chen, K.Y., R.H. Kramer and E.S. Canellakis (1978) Isolation and characterization of surface glycoproteins from L-1210, P-388 and Hela cells, Biochim. Biophys. Acta, 507, 107.
- Czech, M.P. (1984) New perspectives on the mechanism of insuline action, Recent Progress in Hormone Research, 40, 347-377.
- Das, M., T. Miyakawa, C.F. Fox, R.M. Pruss, A. Aharonov and H.R. Herschman (1977) Specific radiolabeling of a cell surface receptor for epidermal growth factor, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 2790-2794.
- Dillner-Centerlind, M.L., B. Axelsson, S. Hammarstrom, U. Hellstrom and P. Perlmann (1980) Interaction of lectins with human T-lymphocytes mitogenic properties, inhibitory effects, binding to the cell membrane and to isolated surface glycopeptides, Eur. J. Immunol., 10, 434-442.
- Doucet, J.P. (1981) Etude des glycoprotéines liant la phytohemagglutinine de Phaseolus vulgaris à la surface des lymphocytes spléniques porcins. Thèse de doctorat. Département de Biochimie. Université de Sherbrooke.
- Drickamer, K. and J.F. Mamon (1982) Phosphorylation of a membrane receptor for glycoproteins. Possible transmembrane orientation of the chicken hepatic lectin, J. Biol. Chem., 257, 15156-15161.
- Dupuis, G. and S. Clairoux-Moreau (1980) Binding of chemical

- derivatives of Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin to pig spleen lymphocytes, Can. J. Biochem., 58, 399-404.
- Dupuis, G. and J.P. Doucet (1981) Separation and localization on sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gels of pig spleen lymphocyte plasma membrane proteins which bind ^{125}I -labelled phytohemagglutinin, Biochim. Biophys. Acta, 669, 171-182.
- Dupuis, G., J.P. Doucet, B. Bastin and J. Cardin (1985) Affinity chromatography purification and partial characterization of phytohemagglutinin-receptor glycoproteins from porcine splenic lymphocytes, Can. J. Biochem. Cell Biol., 63, 932-940.
- Dupuis, G. and F. Radwan (1983) Synthesis of two photoreactive heterobifunctional reagents derived from hexanoic acid, Can. J. Biochem. Cell Biol., 61, 99-106.
- Edelman, G.M., I. Yahara and J.L. Wang (1973) Receptor mobility and receptor-cytoplasmic interactions in lymphocytes, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 1442-1446.
- Elder, J.H., R.A. Pickett II, J. Hampton and R.A. Lerner (1977) Radioiodination of proteins in single polyacrylamide gel slices, J. Biol. Chem., 252, 6510-6515.
- Favero, J.J., I.L. Gordon, J.W. Paker and R.L. O'Brien (1982) Lymphocyte receptors for polyclonal T mitogens. II. High molecular weight glycoproteins are the best candidate sites for mitogenic action by Concanavalin-A and galactose oxidase, Cell. Immunol., 68, 38-52.
- Felsted, R.L., R.D. Leavitt and N.R. Bachur (1975) Purification of the phytohemagglutinin family of proteins from red kidney beans (Phaseolus vulgaris) by affinity chromatography, Biochim. Biophys. Acta, 405, 72-81.

- Glad, C. and C.A.K. Borrebaeck (1984) Affinity of phytohemagglutinin (PHA) isolectins for serum proteins and regulation of the lectin-induced lymphocyte transformation, *J. Immunol.*, 133, 2126-2132.
- Greaves, M.F. and S. Bauminger (1972) Activation of T and B lymphocytes by insoluble phytomitogens, *Nature New Biol.*, 235, 67-70.
- Greaves, M. and G. Janossy (1972) Elicitation of selective T and B lymphocyte responses by cell surface binding ligands, *Transplant. Rev.*, 11, 87-130.
- Hadden, J.W., E.M. Hadden, M.K. Haddox and N.D. Goldberg (1972) Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate: a possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 3024-3027.
- Hayman, M.J. and M.J. Crumpton (1972) Isolation of glycoproteins from pig lymphocyte plasma membrane using Lens culinaris phytohemagglutinin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 47, 923-937.
- Henkart, P.A. and R.I. Fisher (1975) Characterization of the lymphocyte surface receptors for Con A and PHA, *J. Immunol.*, 114, 710-714
- Hjelm, H., K. Hjelm and J. Sjoquist (1972) Protein A from Staphylococcus aureus. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbant for isolation of immunoglobulins, *FEBS Letters*, 28, 73-76.
- Hoffman, L.M. and D.D. Donaldson (1985) Characterization of two Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin genes closely linked on the chromosome, *EMBO J.*, 4, 883-889.
- Horeinstein, A., M.M. Piras, J. Mordoh and R. Piras (1976) Protein phosphokinase activities of resting and proliferating human lymphocytes, *Expt. Cell. Res.*, 101, 260-266.

- Hunter, T. and J. A. Cooper (1985) Protein-tyrosine kinases, *Ann. Rev. Biochem.*, 54, 897-930.
- Jaffe, C.L., H. Lis and N. Sharon (1980) New cleavable photoreactive heterobifunctional cross-linking reagents for studying membrane organisation, *Biochem.*, 19, 4423-4429.
- Ji, T.H. (1977) A novel approach to the identification of surface receptors. The use of photosensitive hetero-bifunctional cross-linking reagent, *J. Biol. Chem.*, 252, 1566-1570.
- Ji, T.H. (1979) The application of chemical cross-linking for studies on cell membranes and the identification of surface reporters, *Biochim. Biophys. Acta*, 559, 39-69.
- Johnson, E.M., J. Karn and V.G. Allfrey (1974) Early nuclear events in the induction of lymphocyte proliferation by mitogens, *J. Biol. Chem.*, 249, 4990-4999.
- Juliano, R.L. and G. Li (1978) Glycoproteins of the CHO cell membranes: Partial fractionation of the receptors for Concanavalin A and wheat germ agglutinin using a lectin immunoprecipitation technique, *Biochemistry*, 17, 678.
- Kabat, E.A., M. Heidelberger and A.E. Bezer (1947) A study of the purification and properties of ricin, *J. Biol. Chem.*, 168, 629-639.
- Kemp, B.E., M. Froscio, A. Rogers and A.W. Murray (1975) Multiple protein kinases from human lymphocytes. Identification of enzymes phosphorylating exogenous histone and casein, *Biochem. J.*, 145, 241-249.
- Kessler, S.W. (1975) Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A, *J.*

- Immunol., 115, 1617-1624.
- Kiehm, D.J. and T.H. Ji (1977) Photochemical cross-linking of cell membranes. A test for natural and random collisional cross-links by millisecond cross-linking, J. Biol. Chem., 252, 8524-8531.
- Kornfeld, R. and S. Kornfeld (1970) The structure of a phytohemagglutinin receptor site from human erythrocytes, J. Biol. Chem., 245 2536-2545.
- Kunitz, M. and M.R. McDonald (1948) Isolation of crystalline ricin, J. Gen. Physiol., 32, 25-31.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, Nature, 227, 680.
- Landsteiner, K. The specificity of serological reactions, K. Landsteiner ed., Cambridge, Mass., (1945) pp.4-5.
- Larsson, E.L. (1981) Mechanism of T cell activation. II. Antigen- and lectin-dependent acquisition of responsiveness to TCGF is a nonmitogenic, active response of resting T cells, J. Immunol., 126, 1323-1326.
- Leavitt, R.D., R.L. Felsted and N.R. Bachur (1977) Biological and biochemical properties of Phaseolus vulgaris isolectins, J. Biol. Chem., 252, 2961-2966.
- Leca, G., L. Boumsell, M. Fabbi, E.L. Reinherz and J.M. Kanellopoulos (1986) The sheep erythrocyte receptor and both α and β chains of the human T-lymphocyte antigen receptor bind the mitogenic lectin (phytohaemagglutinin) from Phaseolus vulgaris, Scand. J. Immunol., 23, 535-544.
- Lindahl-Kiessling, K. and R.D.A. Peterson (1969) The mechanism of phytohemagglutinin (PHA) action. II. The effect of certain

- enzymes and sugars, *Exptl. Cell Res.*, 55, 81-84.
- Lis, H. and N. Sharon (1973) The biochemistry of plant lectins (Phytohemagglutinins), *Ann. Rev. Biochem.*, 42, 541-574.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 265.
- Lwowski, W. (1980) Nitrenes in photoaffinity labeling: speculations of an organic chemist, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 346, 491-500.
- Maino, V.C., N.M. Green and M.J. Crumpton (1974) The role of calcium ions in initiating transformation of lymphocytes, *Nature*, 251, 324-327.
- Majerus, P.W. and G.N. Brodie (1972) The binding of phytohemagglutinins to human platelet plasma membranes, *J. Biol. Chem.*, 247, 4253-4257.
- Mann, D.L., G.N. Rogentine, J.L. Fahey and S. Nathenson (1969) Human lymphocyte membrane (HL-A) alloantigens: isolation, purification and properties, *J. Immunol.*, 103, 282-292.
- Morgan, D.A., F.W. Ruscetti and R. Gallo (1976) Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrow, *Science* 193, 1007-1008.
- Murray, A.W., M. Froscio and B.E. Kemp (1972) Histone phosphatase and cyclic nucleotide-stimulated protein kinase from human lymphocytes, *Biochem. J.*, 129, 995-1002.
- Novogrodsky, A., M. Patya, A.L. Rubin and K.H. Stenzel (1983) Agents that increase cellular cAMP inhibit production of interleukin-2, but not its activity, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 114, 93-98.
- Nowell, P.C. (1960) Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cul-

- tures of normal human leucocytes, *Cancer Research*, 20, 462-468
- O'Brien, K.J., R.M. Condie, C.A. Prody and R.D. Edstrom (1979) Mitogenic response of lymphocytes. Lymphocyte and erythrocyte plasma membrane glycoproteins as inhibitors of lectin-induced lymphocyte mitogenesis, *J. Biol. Chem.*, 254, 168-175.
- Palacios, R. (1982) Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation, *J. Immunol.*, 128, 337-342.
- Peters, K. and F.M. Richards (1977) Chemical cross-linking: reagents and problems in studies of membrane structure, *Ann. Rev. Biochem.*, 46, 523-551.
- Prujansky, A., A. Ravid and N. Sharon (1978) Cooperativity of lectin binding to lymphocytes, and its relevance to mitogenic stimulation, *Biochim. Biophys. Acta*, 508, 137-146.
- Radwan, F. (1982) Synthèse et utilisation de deux réactifs hétérobifonctionnels pour l'identification partielle des récepteurs lymphocytaires de la phytohemagglutinine de Phaseolus vulgaris, Mémoire de maîtrise, département de Biochimie, Université de Sherbrooke.
- Rigas, D.A. and E.E. Osgood (1955) Purification and properties of the phytohemagglutinin of Phaseolus vulgaris, *J. Biol. Chem.*, 212, 607.
- Schwartz, M.A. (1985) A ^{125}I -radiolabel transfer cross-linking reagent with a novel cleavable group, *Anal. Biochem.*, 149, 142-152.
- Schwartz, M.A., O. Prem Das and R.O. Hynes (1982) A new radioactive cross-linking reagent for studying the interactions of pro-

- teins, J. Biol. Chem., 257, 2343-2349.
- Sharon, N. and H. Lis (1972) Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins, Science, 177, 949-959.
- Sjoquist, J., B. Meloun and H. Hjelm (1972) Protein A isolated from Staphylococcus aureus after digestion with lysostaphin, Eur. J. Biochem., 29, 572-578.
- Skoog, V.T., S.F. Nilsson and T.H. Weber (1980) Characterization of human lymphocyte surface receptors for mitogenic and non-mitogenic substances, Scand. J. Immunol., 11, 369-376.
- Smith, K.A. (1980) T-cell growth factor, Immunol. Rev., 51, 337-357.
- Smith, J.W., A.L. Steiner and C.W. Parker (1971) Human lymphocyte metabolism. Effects of cyclic and non-cyclic nucleotides on stimulation by phytohemagglutinin, J. Clin. Invest., 50, 442-448.
- Sons, W., H.J. Unsold and R. Knippers (1976) Increase of chromatin-bound protein kinase after stimulation of lymphocytes by concanavalin A, Eur. J. Biochem., 65, 263-269.
- Spiegel, S. and M. Wilchek (1981) Membrane sialoglycolipids emerging as possible signal transducers for lymphocyte stimulation, J. Immunol., 127, 572-575.
- Sumner, J.B. and S.F. Howell (1936) The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A, J. Bacteriol., 32, 227-237.
- Theofilopoulos, A.N., G.J. Prud'homme, T.M. Fieser and F.J. Dixon (1983) B-cell hyperactivity in murine lupus I. Immunological abnormalities in lupus-prone strains and the activation of normal B-cells, Immunol. Today, 4, 287-301.
- Wang, T., J.E. Foker and A.M. Malkinson (1981) Protein phosphorylation in intact lymphocytes stimulated by concanavalin A, Exptl.

- Cell Res., 134, 409-415.
- Wang, K. and F.M. Richards (1974) An approach to nearest neighbor analysis of membrane proteins; application to the human erythrocyte membrane of a method employing cleavable cross-linkages, J. Biol. Chem., 249, 8005-8018.
- Watkins, W.M., Glycoproteins, A. Gattschalk ed., Amsterdam, (1966) vol. 5, pp.475-483.
- Watkins, W.M. and W.T.J. Morgan (1952) Neutralization of the anti-H agglutinin in the serum by simple sugars, Nature, 169, 825-826.
- Weber, T., C.T. Nordman and R. Grasbeck (1967) Separation of lymphocyte stimulating and agglutinating activities in phytohemagglutinin (PHA) from Phaseolus vulgaris, Scand. J. Haemat., 4, 77-80.
- Wedner, H.J. and C.W. Parker (1975) Protein phosphorylation in human peripheral lymphocytes-stimulation by phytohemagglutinin and N⁶-monobutyryl cyclic AMP, Biochem. Biophys. Res. Comm., 62, 808-815.
- Wilchek, M., S. Spiegel and A. Ravid, Mechanisms of lymphocyte activation, Resch and Kirchner ed., Elsevier/North-Holland, (1981) p.19-30.
- Wray, W., T. Boulikas, V.P. Wray and R. Hancock (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels, Anal. Biochem., 118, 197-203.